

RODRIGO MACIEL CALVET

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS TOXÍGENOS EM
CARCINICULTURA MARINHA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TERESINA-PIAUÍ
2008**

RODRIGO MACIEL CALVET

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS TOXÍGENOS EM
CARCINICULTURA MARINHA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Christina Sanches Muratori

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TERESINA-PIAUÍ
2008**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS TOXÍGENOS EM
CARCINICULTURA MARINHA**

Dissertação elaborada e defendida por:

RODRIGO MACIEL CALVET

Aprovada em: 25/02/2008

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^o Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa

Instituto de Medicina Veterinária

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof.^a Dr.^a Maria Marlúcia Gomes Pereira

Centro de Ciências Agrárias

Universidade Federal do Piauí

Prof.^a Dr.^a Maria Christina Sanches Murtori

Centro de Ciências Agrárias

Universidade Federal do Piauí

(Orientadora)

Dedico,

Aos meus pais, Talib Enes Calvet e Fátima de Nazareth Maciel Calvet (*in memoriam*) pelos ensinamentos, educação e apoio durante toda essa caminhada.

Aos meus amados irmãos Talib Filho, Fábio, Thyago, Emilly, Emersonn, e Caio Victor, companheiros de muitas alegrias, tristezas, brigas harmoniosas e vitórias alcançadas.

Aos meus grandes amigos companheiros de jornada Vandilson, Candinho, Glene, Maxwell, Márcio Edivandro, Anali, Renata, Andressa, Dalinajara e Lucas pelo incentivo e admiração a mim confiada.

À querida Prof.^a Maria de Fátima Viégas Lima pelos grandes e iluminados conselhos que sempre me incentivaram a crescer e buscar o melhor.

Agradecimentos

A Deus, que abençoou minha vida e permitiu a realização deste trabalho, abrindo oportunidades para o meu crescimento profissional e colocando pessoas especiais e iluminadas em meu caminho para admirá-las e tê-las como fonte de inspiração.

São eles:

À Universidade Federal do Piauí pela oportunidade de crescimento profissional;

À Prof.^a Maria Christina Sanches Muratori, pela paciência, dedicação, ensinamentos, oportunidades, orientação, conselhos, enfim, além da grande orientadora, é para mim, uma amiga e mãezona;

À Prof.^a Maria Marlúcia Gomes Pereira amiga e irmã espiritual (da mesma mãezona Fátima Viegas) que contribuiu de forma significativa para a elaboração deste trabalho;

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, pelos conhecimentos repassados;

Aos amigos de mestrado por compartilharmos bons momentos em especial a Célia Maria, Kamilla Vidigal, Danilo Brito, Felipe Moraes e Maxwell Reis, todos maranhenses em busca de conhecimentos no Piauí.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto de pesquisa e aquisição de materiais para o laboratório;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa que custeou minha estadia nesta cidade;

Às fazendas carcinicultoras do litoral piauiense, pela receptividade e aquisição de amostras;

Aos funcionários das fazendas que estavam sempre dispostos a nos receber e ajudar durante as coletas das amostras, em especial ao Gustavo, Marcelo, Comandante Frederico Ayres, Caubí e Big;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro onde busquei aprendizado e fui bem recebido;

Ao Prof.^o Carlos Alberto da Rocha Rosa, por abrir as portas para um estágio na UFRRJ, contribuindo para a realização deste trabalho. Além da disposição, prestatividade e amizade;

Aos irmãos Kelly Keller e Luiz Keller, pela dedicação, ensinamentos e apoio durante o estágio na UFRRJ;

Ao amigo César Kruger, pela prestatividade durante minha estadia no alojamento da Pós - Graduação da UFRRJ;

Aos integrantes da equipe de pesquisa em Micologia e Micotoxicologia da UFRRJ: Ana, Monike, Tati (1), Tati (2), Marcos, Carol, e Águida, pela grande ajuda, ensinamentos e amizade;

À Regina Célia de Jesus Fialho, amiga leal, companheira de laboratório e meu braço direito nas pesquisas (Integrante da Equipe “Projeto Camarão”);

À Aline Marques Monte, pela amizade e ensinamentos no laboratório de Controle Físico – Químico de Alimentos (Integrante da Equipe “Projeto Camarão”);

Ao Atylla Peeter Batista Veloso, Ygor Flávio de Moraes Santos, Hanny de Carvalho e Ana Luísa Alves Marques, pela amizade, companheirismo e aventuras durante nossas viagens à Parnaíba para coletas de amostras (Integrante da Equipe “Projeto Camarão”);

À Cecília Melo de Macedo, Gislêino Guimarães de Moura, Rafael Paz Costa, Edmilson de Oliveira Barros, Rejane Andrade Neves, ex-integrantes da “grande família” projeto camarão, pela ajuda e experiências compartilhadas em nossas viagens;

Ao George Emanuel Pereira da Silva, técnico do Laboratório de Controle Microbiológico dos Alimentos do NUEPPA pela colaboração e ajuda com vidrarias e materiais utilizados para realização das análises;

Ao Sr. Antônio Fernandes da Silva, zelador do NUEPPA pela prestatividade;

Ao funcionário da Pós – Graduação em Ciência Animal, MSc Luís Gomes da Silva, pela paciência, ajuda nas horas de sufoco, e amizade;

À secretária do curso de Medicina Veterinária, Maria Adália de Sousa Rocha pela ajuda e disposição quando sempre precisei;

À todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 CAPITULO I.....	17
2.1 Resumo.....	18
2.2 Abstract.....	19
2.3 Introdução.....	21
2.4 Material e Métodos.....	23
2.5 Resultados e Discussão.....	25
2.6 Conclusões.....	31
2.7Referências bibliográficas.....	31
3 CAPÍTULO II.....	36
3.1 Resumo.....	37
3.2 Abstract.....	38
3.3 Introdução.....	39
3.4 Material e Métodos.....	42
3.5 Resultados e Discussão.....	45
3.6 Conclusões.....	49
3.7 Referências bibliográficas.....	50
4 CAPÍTULO III.....	54
4.1 Resumo.....	55
4.2 Abstract.....	56
4.3 Introdução.....	57
4.4 Material e Métodos.....	60

4.5 Resultados e Discussão.....	62
4.6 Conclusões.....	66
4.7 Referências bibliográficas.....	67
5 CONCLUSÕES FINAIS.....	70
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE TABELAS

Pág.

CAPÍTULO I

Tabela 1. Tabela1 Média anual de umidade, temperatura e de unidades formadoras de colônias fúngicas isoladas dos galpões de armazenamento de rações das fazendas carcinicultoras do litoral do Piauí..... 26

Tabela2. Fungos filamentosos isolados de galpões de armazenamento de rações em carcinicultura..... 27

Tabela 3 Ocorrência das espécies de *Aspergillus* isoladas de galpões de armazenamento de rações em carcinicultura do litoral piauiense..... 28

Tabela 4 Ocorrência das espécies de *Penicillium* isoladas de galpões de armazenamento de rações em carcinicultura do litoral piauiense..... 29

CAPÍTULO II

Tabela 1 Médias das contagens de fungos filamentosos e leveduras (ufc/g) em rações de camarão nas diferentes fases de crescimento cultivados no litoral piauiense..... 45

Tabela 2 Médias das contagens de fungos filamentosos e leveduras (ufc/g) em rações de camarão no período seco e chuvoso..... 46

Tabela 3 Fungos filamentosos isolados de rações utilizadas na carcinicultura piauiense..... 47

Tabela 4 Espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de rações utilizadas na carcinicultura piauiense..... 48

CAPÍTULO III

Tabela 1 Médias das contagens de fungos nos camarões produzidos no litoral piauiense em três fases de cultivo.....	62
Tabela 2 Fungos filamentosos isolados de camarões cultivados no litoral piauiense.....	63
Tabela 3 Espécies do gênero <i>Aspergillus</i> isoladas de camarões cultivados no litoral piauiense.....	64

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS TOXÍGENOS EM CARCINICULTURA MARINHA

RESUMO

Este trabalho objetivou quantificar e identificar fungos toxígenos dos ambientes dos galpões de estocagem, das rações e dos camarões de quatro das quatorze propriedades carcinicultoras piauienses. Foi utilizada a técnica de sedimentação em placas de Petri para a contagem no ambiente e o método da diluição decimal seriada para ração e camarão. O potencial toxígeno dos *Aspergillus* foi avaliado no Agar Leite de Coco. Prevaleram as espécies dos gêneros: *Aspergillus* e seus teleomorfos e *Penicillium*. Os ambientes dos galpões apresentaram (1,99 a 2,49 log₁₀), com predominância de *A. terreus* (30,7%) e *P. citrinum* (43,3%). As contagens nas rações que foram de 0,65 ufc/g a 2,66 ufc/g log₁₀ variaram entre as propriedades em todos os períodos e fases de cultivo, independentemente do local de coleta e das condições das embalagens, com prevalência de *A. flavus* (38,2%). As fazendas pesquisadas foram semelhantes quanto às contagens em camarão, com presença de *Aspergillus* das seções Circundati, Terrei, Nigri e Flavi. As espécies isoladas *A. flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. ochraceus* e *A. terreus* produziam micotoxinas, caracterizando o sistema produtivo com fonte de contaminação para rações e manipuladores.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, micotoxinas, *Aspergillus*, *Penicillium*, camarão

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FUNGI TOXIGENICS IN CULTURE OF MARINE SHRIMP

ABSTRACT

This study aimed to quantify and identify fungi toxigenics environments of the warehouses of storage, and diets of shrimp, four of the fourteen properties shrimp culture of Piauí. It used the technique of sedimentation in the countdown signs for the environment and the method of serial dilution decimal to feed and shrimp. The potential toxigenic of *Aspergillus* was evaluated in Coconut Medium Agar. The results were processed in log₁₀, correlated, submitted to the analysis of variance and application of SNK test for comparison of means. The qualitative variables were analyzed by the Chi-square test. Prevalence of species of the genera: *Aspergillus* and *Penicillium* and its teleomorfos. The environments of the warehouses had similar counts, with a predominance of *A. terreus* (30.7%) and *P. citrinum* (43.3%). The counts in diets ranged from the properties in all periods and stages of cultivation, regardless of the place of collection and the conditions of packaging, with prevalence of *A. flavus* (38.2%). The farms surveyed were similar on the counts on shrimp, with the presence of *Aspergillus* sections Circundati, Terrei, Nigri and Flavi. The isolated species *A. flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. ochraceus* e *A. terreus* produce mycotoxins, characterizing the production system with a source of contamination for rations and manipulators.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, mycotoxins, *Aspergillus*, *Penicillium*, shrimp

INTRODUÇÃO

A produção mundial de camarões cultivados e capturados, em 2006, foi da ordem de 6.624.387 milhões de toneladas, das quais 47,77% oriundos dos cultivos (FAO, 2006). O Brasil obteve, nesses últimos anos, a liderança mundial em produtividade e, em 2003, teve a maior produção do camarão *Litopenaeus vannamei* do hemisfério ocidental. Neste mesmo ano, verificou-se a primeira queda na produção e produtividade brasileira dos últimos sete anos, decorrente, principalmente, da incidência do vírus IMNV (Mionecrose Infecciosa), da baixa cotação do dólar e o "dumping" promovido pelos Estados Unidos contra o produto brasileiro. Em 2006, a produção brasileira foi de 65.000 toneladas de camarão, dos quais 843 toneladas foram provenientes da carcinicultura piauiense garantindo o sexto lugar no ranking nacional (ABCC, 2009).

A ração representa um dos principais custos operacionais no sistema produtivo de camarões, deste modo é fundamental que os carcinicultores avaliem, para reduzir os prejuízos, todas as formas de prevenção de perdas e as causas de alterações. Dentre as alterações prováveis, os fungos devem ser pesquisados pela capacidade de deteriorar rações e produção micotoxinas.

Os fungos são organismos eucarióticos cujos núcleos são dispersos em um micélio contínuo ou septado. Não possuem plastos ou pigmentos fotossintéticos e sua nutrição é obtida por absorção. São saprofíticos, parasitos facultativos ou biotróficos. Crescem como célula única (leveduras) ou como colônias filamentosas multicelulares (bolores). Encontram-se em abundância no solo, nos vegetais e nas águas e se reproduzem por meios de ciclos teleomorfo e anamorfo (TRABULSI et al, 2002).

Alguns fungos são capazes de produzir metabólitos secundários que são tóxicos e às vezes carcinogênicos aos animais e ao homem. Estes são chamados de fungos toxígenos e seus metabólitos de micotoxinas. São conhecidas mais de 80 espécies de fungos toxígenos, que produzem mais de 300 diferentes tipos de micotoxinas em quase todos os tipos de produtos alimentícios, como arroz, milho, feijão, trigo, cevada, soja, castanha do Pará, farelo de peixe, frutas, presunto, queijo, leite, e até vinho (DETROY, 1971; BATISTA, 2000).

Os principais fungos toxígenos pertencem a seis gêneros taxonômicos que são: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicilium*, *Rhizoctonia* e *Stachybotrys*. Os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicilium* são os mais importantes, os mais freqüentemente encontrados e os maiores produtores de micotoxinas (BATISTA e FREITAS, 2000; GIMENO, 2000).

Fungos produtores de micotoxinas podem ser classificados, de acordo com o habitat e o substrato oferecido para o seu desenvolvimento, em três grupos: fungos de campo, que geralmente contaminam plantas, antes mesmo que se realizem as colheitas; fungos de armazenamento, que se desenvolvem durante o armazenamento do alimento; e fungos de decomposição, tornando o alimento impróprio para o consumo devido à deterioração e produção de micotoxinas (CONCON, 1998 apud MÍDIO e MARTINS, 2000; GIMENO, 2000).

As micotoxinas, produtos do metabolismo de fungos toxígenos e patogênicos são contaminantes de alimentos e rações. Esta contaminação pode acontecer diretamente e de difícil controle e que podem acontecer nas várias etapas de produção, processamento e armazenamento devido a processos naturais e ambientais (TAVEIRA e MÍDIO, 1999; MÍDIO e MARTINS, 2000).

Dentre os contaminantes de alimentos, as micotoxinas parecem ser as mais representativas e dentre estas, as aflatoxinas têm sido as mais estudadas pela sua grande importância do ponto de vista toxicológico. A ingestão de alimentos contaminados com estas micotoxinas em baixos teores, com uma dada frequência e por tempo prolongado, pode levar ao aparecimento de efeitos crônicos, representando um sério risco para a saúde humana (TAVEIRA e MÍDIO, 1999).

A presença de micotoxinas na cadeia alimentar pode ocorrer de forma direta e indireta. Na forma direta, o substrato do alimento serve como meio para o desenvolvimento do fungo e a produção da toxina, podendo ocorrer em qualquer estágio, seja durante a produção, beneficiamento, transporte e armazenamento. Na forma indireta, os ingredientes do alimento podem estar contaminados com a micotoxina, ou ainda, como no caso de produtos de origem animal, de animais que consumiram ração contaminada (CARVALHO, 1995).

Muitos surtos com alta mortalidade em animais de produção tem sido causados por micotoxinas, principalmente por aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona e ocratoxina A. São registradas perdas na produção causadas pela combinação dessas micotoxinas e sua presença nas rações. Ocorre diminuição da produtividade, como declínio na produção de ovos, problemas reprodutivos, vulnerabilidade a infecções aumentando a morbidade e, por último, a mortalidade. A presença de resíduos de micotoxinas no leite, em ovos e na carne, tem contribuído para as perdas econômicas e queda da produtividade animal. Os mais afetados têm sido as aves, os suínos, o gado leiteiro e os cavalos (BATH e VASANTHI, 1999).

No processo de elaboração das rações utilizadas na alimentação de camarões, são empregados diversos ingredientes balanceados para garantir um bom desempenho na

produtividade animal. Destes que são utilizados, o milho, a cevada, o centeio, o trigo entre outros, são as principais fontes energéticas oferecidas ao animal e representam substratos ideais para o desenvolvimento de fungos e micotoxinas.

Baseados nestes dados foram formuladas a seguinte hipótese: as condições inadequadas de armazenamento, utilização de matérias-primas contaminadas, a manipulação inadequada e fatores ambientais como o clima, podem influenciar consideravelmente na presença e no crescimento de fungos micotoxígenos e suas micotoxinas nas rações utilizadas na carcinicultura. A presença destes fungos nas rações pode contaminar os camarões.

Para testar as hipóteses, os objetivos do presente trabalho foram:

Verificar as condições de armazenamento de ração nas fazendas de camarão, nos períodos secos e chuvosos;

Quantificar, isolar e identificar fungos toxígenos nos galpões de armazenamento das rações pela técnica de sedimentação em placas de Petri;

Quantificar, isolar e identificar fungos toxígenos na ração estocada e em uso nas diferentes fases de cultivo dos camarões e;

Quantificar, isolar e identificar fungos toxígenos em camarões nas suas diferentes fases de crescimento.

Para avaliar a presença de fungos micotoxígenos em carcinicultura marinha, este trabalho foi dividido estruturalmente em três capítulos: “Isolamento e identificação de fungos toxígenos em galpões de armazenamento de rações em carcinicultura marinha”; “Fungos toxígenos isolados e identificados em rações utilizadas em carcinicultura marinha” e “Isolamento e identificação de fungos micotoxígenos em camarões marinhos cultivados”.

Os capítulos foram apresentados na forma de artigos científicos obedecendo às normas da Revista Ciência Rural, os quais foram submetidos à publicação.

Capítulo I

1 **Isolamento e identificação de fungos toxígenos em galpões de armazenamento de rações**
2 **em carcinicultura marinha**

3
4 **Isolation and identification of toxigenic fungi in warehouses for storage of feed on**
5 **marine shrimp culture**

6
7 Rodrigo Maciel Calvet^{I*1}; Maria Christina Sanches Muratori^{II}; Maria Marlúcia Gomes
8 Pereira^{II}; Regina Célia de Jesus Fialho^{III}; Aline Marques Monte^{III}, Átyla Peeter Batista
9 Veloso^{III}; Ygor Flávio de Moraes Santos^{III}; Amilton Paulo Raposo Costa^{II}, Kelly Moura
10 Keller^{IV}, Luiz Antônio Moura Keller^{IV}, Carlos Alberto da Rocha Rosa^V

11
12 **RESUMO**

13
14 Os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são considerados como os principais
15 produtores de micotoxinas e estão relacionados também à contaminação ambiental. Deste
16 modo, objetivou-se quantificar e identificar a micobiota toxígena dos galpões de
17 armazenamento das rações em carcinicultura piauiense, utilizando a técnica de sedimentação
18 em placas de Petri com Agar Dextrose Batata e ácido tartárico a 10% que foram mantidas
19 abertas nos galpões em três pontos distintos por 20 minutos onde foram incubadas por cinco a
20 sete dias a 25,0° C. Após incubação, contaram-se as colônias fúngicas e os resultados foram
21 expressos em ufc/cm² por semana (1,99 a 2,49 log₁₀), correlacionados, submetidos à análise

^I Médico Veterinário, Mestrando em Ciência Animal – CCA/Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil
CEP 64.049-550. e-mail: rodrigocalvet@hotmail.com;

^{II} Docentes Departamento de Morfofisiologia Veterinária – CCA/ Universidade Federal do Piauí;

^{III} Graduandos do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal do Piauí;

^{IV} Médicos Veterinários, Mestrandos em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;

^V Professor Titular de Micologia e Micotoxicologia – DMIV/IV/ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

*Autor para correspondência

1 de variância e aplicação do teste de SNK para comparação das médias. As variáveis
2 qualitativas foram analisadas pelo teste não paramétrico do χ^2 (Qui-quadrado). A
3 interpretação da qualidade do ambiente seguiu os padrões de Sadler e a identificação dos
4 gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* seguiu as chaves de identificação de KLICH e PITT (2002).
5 O potencial toxígeno dos *Aspergillus* isolados foi avaliado no Agar Leite de Coco. As
6 contagens fúngicas dos galpões das propriedades não diferiram entre si ($p < 0,05\%$) e foram
7 classificados como “péssimos” por apresentarem contagens superiores a $1,30 \times 10^6$ ufc/cm² por
8 semana. Foram isoladas 130 cepas pertencentes a 11 gêneros fúngicos. Prevaleram as
9 espécies dos gêneros: *Aspergillus* e seus teleomorfos (40,0%) e *Penicillium* (32,3%). Foram
10 identificadas 39 cepas de *Aspergillus*, prevalecendo o *Aspergillus terreus* (30,7%) e 30 cepas
11 do gênero *Penicillium*, com maior predominância de *Penicillium citrinum* (43,3%). Também
12 foram identificados *Byssochlamys fulva* e *Fusarium verticillioides* que apresentaram potencial
13 toxígeno. A presença dos fungos produtores de micotoxinas como *A. niger*, *A. awamori* e *A.*
14 *flavus* caracteriza o ambiente dos galpões de carcinicultura como uma fonte de contaminação
15 para rações, manipuladores e camarões.

16

17 PALAVRAS-CHAVE: *Litopenaus vannamei*, micotoxina, *Aspergillus*, *Penicillium*,
18 *Byssochlamys fulva* e *Fusarium verticillioides*

19

20 ABSTRACT

21

22 The genera *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* are considerate like principal producers of
23 mycotoxins, and they are also related to environmental contamination. The aim of this
24 research was to quantify and identify the toxigenic mycobiota of warehouses storage of
25 rations in shrimp culture state of Piauí, using the technique of plating Petri with sedimentation

1 in Potato Dextrose Agar and tartaric acid to 10% that have been kept open in warehouses at
2 three different points for 20 minutes where they were incubated for five to seven days at 25.0°
3 C. After incubation, counted up the fungal colonies and the results were expressed in
4 cfu/cm²/week (1,99 a 2,49 log₁₀), correlated, submitted to the analysis of variance and
5 application of SNK test for comparison of means. The qualitative variables were analyzed by
6 chi-square). The interpretation of the environment quality was followed the patterns of Sadler
7 and identification of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* followed the keys of
8 identification by KLICH and PITT (2002). The potential toxigenic of *Aspergillus* alone has
9 been estimated at Coconut Medium Agar. The fungal counts of warehouses of the properties
10 did not differ from each other (p <0.05%), and were classified as "extremely poor" by present
11 counts greater than 1.30 x 10 cfu/cm²/week. There were isolated 130 strains belonging the 11
12 fungal genera. It showed species of the genera: *Aspergillus* and their teleomorph (40.0%) and
13 *Penicillium* (32.3%). We identified 39 strains of *Aspergillus*, it being the *Aspergillus terreus*
14 (30.7%) of bigger prevalence and 30 strains of the genus *Penicillium* with higher prevalence
15 of *Penicillium citrinum* (43.3%). It was identified *Byssochlamys fulva* and *Fusarium*
16 *verticillioides* that present potential toxigenic. The presence of the fungi producer of
17 mycotoxins as *A. niger*, *A. awamori* and *A. flavus* characterizes the environment of
18 warehouses, shrimp culture as a source of contamination for rations, handlers and shrimp.

19

20 KEY WORDS: *Litopenaus vannamei*, mycotoxin, *Aspergillus*, *Penicilium*, *Byssochlamys*
21 *fulva* e *Fusarium verticillioides*

22

1 INTRODUÇÃO

2

3 Durante muito tempo os fungos foram considerados vegetais, mas a partir de 1969
4 passaram a ser classificados como pertencentes ao quinto Reino, o Reino Fungi. Os fungos
5 são seres vivos eucarióticos que podem apresentar um ou mais núcleos, como as leveduras ou
6 como os fungos filamentosos e os cogumelos, respectivamente. Não sintetizam clorofila nem
7 qualquer pigmento fotossintético (TRABULSI et al., 2002). Os conídios dos fungos
8 filamentosos são abundantes e amplamente encontrados na natureza, crescem rapidamente no
9 solo, em plantas, em alimentos, em papel e até em vidros. De um modo geral, a umidade
10 presente no ambiente e as condições de estocagem favorecem a proliferação dos fungos em
11 alimentos (FONSECA, 2000).

12 Os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são considerados como os principais
13 gêneros produtores de micotoxinas (BATISTA e FREITAS, 2000) e podem estar presentes na
14 microbiota fúngica do ambiente.

15 As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos com baixo peso molecular que
16 quando presentes nos alimentos e rações podem causar problemas para a saúde do
17 consumidor, tais como: efeitos carcinogênicos, teratogênicos, convulsões, alucinações,
18 hemorragias, até mesmo a morte (BATISTA e FREITAS, 2000; MIDIO e MARTINS, 2000;
19 BAPTISTA, 2004).

20 A microbiota ambiental contém muitas espécies de fungos, bactérias, vírus entre
21 outros, sendo os dois primeiros os mais importantes na deterioração de alimentos (MELO et
22 al., 2000) e de rações (DALCERO et al., 1997, ROSA et al., 2006). A contaminação das
23 rações pode ser decorrente dos fungos presentes no ambiente de cultivo dos ingredientes, na
24 colheita, nas instalações da fábrica, durante o transporte e armazenamento inadequado em
25 galpões com umidade elevada em seu interior (GIMENO, 2000).

1 As condições ambientais dos galpões de armazenamento de rações como umidade
2 relativa e temperatura, podem favorecer o desenvolvimento fúngico caso não sejam
3 controladas. Portanto é necessário prevenir a contaminação do ar, e a complexidade da
4 situação requer uma análise cuidadosa destas variáveis e assim estabelecer a mais eficiente
5 técnica de controle para o ambiente (SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2005).

6 BORÉM et al (2000), constataram fungos toxígenos no ar e em sementes de feijão
7 armazenadas em ambiente com atmosfera modificada prevalecendo espécies de *A. niger*, *A.*
8 *flavus*, *A. fumigatus*, *Fusarium semitectum* e *Alternaria* spp.

9 GAVA (2000) ao avaliar ambientes de indústrias alimentícias isolou *Aspergillus flavus*
10 na área de manipulação de doces, caracterizando o ambiente como fator de risco para os
11 produtos e manipuladores. O autor sugere que sejam estabelecidos padrões brasileiros para
12 contaminação biológica de ambientes industriais.

13 O *Penicillium citrinum* é potencialmente produtor da citrinina, micotoxina de
14 toxicidade moderada que acomete os rins dos animais monogástricos ocasionando perda de
15 peso devido à degeneração renal, já o *P. citreonigrum* é o principal produtor de citreoviridina,
16 causadora do beribéri cardíaco agudo, enfermidade que afeta o homem, podendo ocasionar a
17 morte em dias (ROSA et al, 1998, 2006, PITT, 2004).

18 LIN e DIANESE (1976) desenvolveram um método para identificação de fungos
19 toxígenos, que utiliza o Agar Leite de Coco (CAM), baseado na produção de fluorescência
20 azul-violeta e uma pigmentação específica no meio de cultura na presença de micotoxina. De
21 um modo geral, os métodos utilizados para a detecção de fungos toxígenos baseiam-se na
22 produção de micotoxina em extrato sólido ou líquido, extração da toxina com solventes
23 orgânicos, purificação, concentração e detecção por Cromatografia de Camada Delgada
24 (FILTENBORG e FRISVAD, 1980).

1 Os fungos podem causar diversas enfermidades em humanos e em animais, dentre elas
2 há a pneumonite por hipersensibilidade, causada por vários agentes, dentre eles o *Penicillium*.
3 Esta enfermidade é pouco diagnosticada e isto se deve a diversas razões como: a não análise
4 da história ocupacional, ambiental e rotina de pacientes com queixas respiratórias; a
5 inespecificidade dos sinais e sintomas e a normalidade do radiograma, tomografia
6 computadorizada de alta resolução e os testes de função pulmonar (BAGATIN 2006).

7 Por não existirem padrões específicos para avaliar a qualidade microbiológica do
8 ambiente de indústria alimentícia e de galpões de armazenamento de ração, são utilizados
9 para esta finalidade os parâmetros da Resolução nº 9, de 16 de janeiro de 2003, referente aos
10 Padrões de Qualidade do Ar Interior, em Ambientes Climatizados Artificialmente de uso
11 Público e Coletivo (BRASIL, 2003). De acordo com a Resolução nº 9, de 16 de janeiro de
12 2003, “é inaceitável a presença de fungos patogênicos e toxígenos em interiores de ambientes
13 públicos e coletivos” (BRASIL, 2003).

14 No litoral piauiense estão localizadas propriedades carcinicultoras que adquirem
15 rações comerciais para as diversas fases do ciclo de cultivo dos camarões. Para manter o
16 estoque, as embalagens de rações são armazenadas em galpões de alvenaria sobre estrado de
17 madeira sem controle das condições ambientais. Para o abastecimento diário, as mesmas são
18 transferidas para depósitos próximos às margens dos viveiros. Deste modo, objetivou-se
19 quantificar e identificar a micobiota toxígena dos galpões de armazenamento de rações da
20 carcinicultura piauiense.

21

22 MATERIAL E MÉTODOS

23

24 No período de agosto de 2006 a junho de 2007 avaliou-se as condições ambientais e a
25 microbiota fúngica dos galpões de armazenamento de ração em quatro das quatorze

1 propriedades carcinívoras existentes no litoral piauiense (delimitado entre 2° 55' 51,39''S –
2 2° 58' 04,31''S a 41° 20' 09,35''O – 41° 26' 33,52''O), que foram sorteadas e identificadas
3 para fins de pesquisas como “A”, “B”, “C” e “D”.

4 Para avaliar as condições ambientais dos galpões realizou-se a contagem fúngica pela
5 sedimentação em placas de Petri contendo o Agar Dextrose Batata acidificado com ácido
6 tartárico a 10% (SVEUM, 1992). A interpretação da qualidade do ambiente seguiu os padrões
7 de Sadler (DI FÁBIO, 1990). As placas foram abertas dentro dos galpões em três pontos
8 distintos por 20 minutos. Durante este período a umidade relativa (UR) e a temperatura eram
9 medidas utilizando-se um termohigrômetro Inconterm[®]. Após esse período, as placas foram
10 fechadas e lacradas com filme plástico, em seguida foram transportadas em recipientes
11 isotérmicos contendo gelo reciclável até o Laboratório de Controle Microbiológico de
12 Alimentos da Universidade Federal do Piauí, onde foram incubadas em estufa B.O.D. por um
13 período de cinco a sete dias a 25,0° C. Após incubação, contaram-se as colônias fúngicas e os
14 resultados foram expressos em ufc/cm² por semana, e realização de cálculos baseados na
15 recomendação de MOREIRA DA SILVA (1996).

16 Para identificação das colônias fúngicas isoladas foram utilizadas as técnicas descritas
17 por PITT & HOCKING (1999). As colônias pertencentes ao gênero *Fusarium* foram
18 repicadas em V-8 juice agar (V-8J) e enviadas para o Laboratório do Núcleo e Pesquisas
19 Micológicas e Micotoxicológicas (Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto
20 de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro). As colônias dos gêneros
21 *Aspergillus* e *Penicillium* foram armazenadas em Malt Extract Agar (MEA) e mantidas em
22 refrigeração até identificação das espécies.

23 Para as cepas fúngicas pertencentes ao gênero *Aspergillus e Penicillium* foram
24 utilizadas as chaves de identificação descritas por KLICH & PITT (2002), baseadas na
25 semeadura em quatro meios básicos: Czapek Yeast Extract Agar (CYA); Malt Extract Agar

1 (MEA), Czapek Yeast Extract Agar 20% Sucrose (CY20S) e Glycerol Nitrate Agar 25%
2 (G25N). Preparou-se uma suspensão de conídios a partir de cada cepa em 0,5 mL de meio
3 constituído de 0,2% de agar-agar e 0,05% de Tween 80TM, distribuído em tubos de hemólise
4 e previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos (PITT & HOCKING, 1999). A seguir,
5 introduziu-se a agulha de platina na suspensão de conídios transferido-os para três pontos
6 equidistantes nas placas contendo CYA; MEA, CY20S e G25N. Estas placas foram incubadas
7 por sete dias a 25° C. Após a incubação, visando à identificação das espécies, observaram-se
8 suas estruturas micromorfológicas e as características macroscópicas das colônias (diâmetro,
9 textura, forma, aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios e pigmento
10 solúvel, produção e cor de exsudato).

11 O potencial toxígeno dos *Aspergillus* isolados foi avaliado utilizando o Agar Leite de
12 Coco (CAM) após a inoculação e incubação por sete dias a 25° C. Posteriormente, verificou-
13 se a pigmentação produzida pelo fungo no meio, e a fluorescência através de um cromatovisor
14 com luz ultravioleta de $\lambda = 366\text{nm}$. A fluorescência característica da produção de micotoxina
15 foi expressa com o símbolo (+) para positividade e (-) para negatividade (LIN e DIANESE,
16 1976).

17 Os resultados das contagens foram transformados em \log_{10} , correlacionados e
18 submetidos à análise de variância e aplicação do teste de SNK para comparação das médias
19 utilizando o Pacote Estatístico SIGMA STAT (1994). Para análise das variáveis quantitativas
20 foi utilizado o teste não paramétrico do χ^2 Qui-quadrado (SAMPAIO, 2002).

21

22 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

23

24 A American Public Health Assossiation, citada por SVEUM et al., 1992, determina
25 que um ambiente para manipulação de alimentos deve ter no máximo $3,0 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$ fungos

1 filamentosos e leveduras por semana (1,48 em \log_{10}). Sadler (DI FÁBIO, 1990) classifica a
 2 qualidade do ambiente pela contagem de colônias de fungos presentes. Nesta tabela as
 3 contagens médias das colônias no ambiente variam de zero a $1,20 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$ que são
 4 classificados como “excelente” até “muito ruim”, respectivamente (ANEXO I). Contagens
 5 fúngicas iguais ou superiores a $1,30 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$ o autor classifica o ambiente como
 6 “péssimo”. Os ambientes dos galpões das propriedades pesquisadas apresentaram contagens
 7 fúngicas semelhantes ($p= 0,454$), com valores superiores a $1,30 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$ por semana. Os
 8 resultados obtidos nos galpões de armazenamento analisados quando comparados com a
 9 tabela de Sadler foram classificados como “péssimos” pelas contagens obtidas (Tabela 1). O
 10 que sugere a necessidade de controle do ar do ambiente.

11 **Tabela1** Média anual de umidade relativa (UR), temperatura e de unidades formadoras de
 12 colônias fúngicas (ufc/cm^2) isoladas dos galpões de armazenamento de rações das fazendas
 13 carcinicultoras do litoral do Piauí.

Propriedades	Parâmetro analisado		
	Umidade (%)	Temperatura (° C)	$\text{ufc/cm}^2/\text{semana}$
A	68,5 ^a	30,0 ^a	2,42 ^a
B	66,8 ^a	30,8 ^a	2,46 ^a
C	58,8 ^a	31,2 ^a	2,49 ^a
D	72,0 ^a	32,3 ^a	1,99 ^a

14 $\text{ufc/cm}^2/\text{semana}$ = unidades formadoras de colônias por centímetro quadrado. ^a = letras iguais
 15 resultados semelhantes nas mesmas colunas ($p<0,05$).
 16

17 Os valores máximos recomendados (BRASIL, 2003) para umidade e temperatura em
 18 um ambiente são 65,0% e 27,0° C, respectivamente, e ambientes quentes e úmidos favorecem
 19 o desenvolvimento de fungos filamentosos e de leveduras (TRABULSI et al., 2002), inclusive
 20 em rações estocadas previamente contaminadas (GIMENO, 2000). Durante o período
 21 experimental, no momento da coleta a temperatura e umidade variaram de 29,4°C a 32,1° C e
 22 67,0 a 67,5%, respectivamente (Tabela 1). A região possui clima tropical úmido com médias

1 em 2007 de umidade e temperatura de 69% e 27°C, respectivamente, e precipitação que
 2 variou de 3 a 226 mm (CONDIÇÕES CLIMÁTICAS, 2007). As fazendas carcinicultoras são
 3 instaladas no litoral piauiense próximo ao equador (latitude 0°), margeando estuários, por este
 4 motivo, o clima da região interfere no ambiente dos galpões favorecendo as elevadas
 5 contagens fúngicas observadas (Tabela 1). Deste modo, é necessário que as empresas
 6 controlem os ambientes dos galpões conforme recomendam SIQUEIRA JÚNIOR et al.
 7 (2005), para prevenir a contaminação FONSECA (2000) e deterioração (MELO et al., 2000)
 8 das rações estocadas para alimentar os camarões cultivados no litoral piauiense.

9 Os resultados em relação à prevalência dos gêneros fúngicos encontrados nos galpões
 10 de armazenamento de rações utilizados na carcinicultura piauiense encontram-se na Tabela 2,
 11 sendo isoladas 130 cepas pertencentes a 11 gêneros fúngicos.

12 **Tabela 2** Fungos filamentosos isolados de galpões de armazenamento de rações em
 13 carcinicultura

Gênero Fúngico	Números de Isolados	Ocorrência (%)
<i>Aspergillus</i> spp. e teleomorfos	52 ^a	40,0
<i>Penicillium</i> spp. e teleomorfos	42 ^a	32,3
<i>Cladosporium</i> spp.	08 ^b	6,2
<i>Curvularia</i> spp.	05 ^b	3,9
<i>Alternaria</i> spp.	04 ^b	3,1
<i>Fusarium</i> spp.	03 ^b	2,3
<i>Aureobasidium</i> spp.	02 ^b	1,5
<i>Ulocladium</i> spp.	02 ^b	1,5
<i>Byssochlamys</i> spp.	01 ^b	0,8
<i>Paecilomyces</i> spp	01 ^b	0,8
<i>Epicocum</i> spp	01 ^b	0,8
Total	130	100,0

14 ^{a,b} = letras iguais resultados semelhantes na mesma coluna ($p < 0,05$). $\chi^2 = 333,7$.

1 As espécies fúngicas prevalentes no ambiente dos galpões pertenciam aos gêneros
 2 *Aspergillus* e seus teleomorfos (40,0%) e *Penicillium* (32,3%), os demais gêneros também
 3 têm importância para a qualidade ambiental (Tabela 2). Foram identificadas 39 cepas de
 4 *Aspergillus*, a maior prevalência foi de *A. terreus* (30,7%). Também foram isoladas outras
 5 espécies toxígenas importantes como o *A. niger*, *A. flavus* e *A. parasiticus* (Tabela 3). Destas
 6 espécies, apenas três cepas do *A. niger*, duas do *A. awamori* e uma do *A. flavus* apresentaram
 7 fluorescência no CAM, indicando que eles possuíam capacidade toxígena. As demais cepas
 8 não apresentaram fluorescência no cromatovisor, o que não descaracteriza sua capacidade de
 9 ser potencialmente toxígeno, tornando-se necessária a confirmação utilizando o método de
 10 Plug Agar conforme recomendam FILTENBORG e FRISVAD, (1980) e PEREIRA, (2003).

11 A qualidade do ambiente dos galpões de armazenamentos de rações analisados não se
 12 enquadra nas recomendações da legislação vigente para ambientes internos (BRASIL, 2003)
 13 devido à presença destas espécies potencialmente toxígena (BATISTA e FREITAS, 2000)
 14 isoladas (Tabela 3).

15 **Tabela 3** Ocorrência das espécies de *Aspergillus* isoladas de galpões de armazenamento de
 16 rações em carnicultura do litoral piauiense

Seção	Números de Isolados	Ocorrência (%)	Isolados fúngicos com fluorescência
Seção Terrei			
<i>A. terreus</i>	12 ^a	30,7	-
Seção Nigri			
<i>A. awamori</i>	08 ^a	20,5	2(+)
<i>A. niger</i>	07 ^a	18,0	3(+)
Seção Flavi			
<i>A. oryzae</i>	06 ^a	15,4	-
<i>A. flavus</i>	04 ^a	10,3	1(+)
<i>A. parasiticus</i>	02 ^a	5,1	-
Total	39	100,00	6(+)

1 ^a = letras iguais resultados semelhantes na mesma coluna ($p < 0,05$). $\chi^2 = 10,5$.

2 *A. flavus* e *A. parasiticus* no ambiente interno representam perigo potencial, pois pode
3 ocasionar enfermidades como aspergilose (GAVA 2000; AKAN et al., 2002), alergias e
4 problemas respiratórios nos trabalhadores pelo contato e inalação de conídios. Estas espécies
5 foram isoladas nos ambientes dos galpões de carcinicultura (Tabela 3) e por este motivo,
6 servem como reservatório de fungos toxígenos, possibilitando a exposição dos manipuladores
7 a enfermidades respiratórias e a contaminação das rações, principalmente quando as
8 embalagens já estão abertas.

9 No ambiente dos galpões foram também identificadas trinta espécies do gênero
10 *Penicillium* e dentre elas a maior predominância foi do *P. citrinum* (43,3%) conforme pode
11 ser verificado na Tabela 4, que é potencialmente micotoxígeno conforme indicam PITT
12 (2004) e ROSA et al., (2006).

13 **Tabela 4** Ocorrência das espécies de *Penicillium* isoladas de galpões de armazenamento de
14 rações em carcinicultura do litoral piauiense

Espécies	Número de Isolados	Ocorrência (%)
<i>P. citrinum</i>	13 ^a	43,3
<i>P. funiculosum</i>	05 ^b	16,6
<i>P. citreonigrum</i>	04 ^b	13,3
<i>P. pinophilum</i>	03 ^b	10,0
<i>P. fellutanum</i>	01 ^b	3,3
<i>P. minioluteum</i>	01 ^b	3,3
<i>P. brevicompactum</i>	01 ^b	3,3
<i>P. implicatum</i>	01 ^b	3,3
<i>P. purpurogenum</i>	01 ^b	3,3
Total	30	100,0

15 ^{a,b} = letras iguais resultados semelhantes na mesma coluna ($p < 0,05$). $\chi^2 = 21,02$.

16 A simples presença de *Penicilium* em um ambiente não caracteriza o perigo levantado
17 por (PITT, 2004), entretanto, a constante inalação dos seus conídeos pode favorecer

1 enfermidades respiratórias (BAGATIN 2006) e alérgicas para pessoas que permaneçam em
2 áreas com elevadas contagens fúngicas.

3 No ambiente dos galpões foram identificadas também outras espécies de fungos
4 potencialmente toxígenos: *Byssochlamys fulva* e *Fusarium verticillioides*.

5 Para KELLER et al, (2005), a identificação e a determinação da micobiota
6 contaminante e de suas características fisiológicas, nutricionais e toxígenas revestem-se de
7 grande importância para o estabelecimento e a análise do risco de exposição do homem e dos
8 animais de criação a estes fungos e suas potenciais micotoxinas, para prevenção dos vários
9 problemas para a saúde inerentes ao consumo de alimentos e de ração contaminada
10 (BATISTA e FREITAS, 2000; MIDIO e MARTINS, 2000; BAPTISTA, 2004). A origem dos
11 fungos isolados nos galpões da carcinicultura piauiense (Tabela 3 e 4) pode estar relacionada
12 à utilização de ração previamente contaminada, a manipulação inadequada, a utensílios, a
13 fatores ambientais, presença de vetores e animais domésticos no local. Pelo exposto
14 recomenda-se um controle efetivo da qualidade do ambiente interno dos galpões para
15 armazenamento de rações, visando prevenir a disseminação dos fungos nas rações e no
16 ambiente em geral.

17

18 **CONCLUSÃO**

19

20 No ambiente de galpões de carcinicultura piauiense estavam presentes fungos dos
21 gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Byssoclamis* e *Alternaria* que se mostraram
22 potencialmente toxígenos em quantidades variadas.

23 As condições ambientais de umidade relativa e de temperatura dos galpões para
24 estocagem de ração das propriedades carcinicultoras piauienses foram propícias ao
25 desenvolvimento de fungos.

1 As espécies *A. niger*, *A. awamori*, e *A. flavus* isoladas do ambiente interno dos galpões
2 de armazenamento de rações em carcinicultura piauiense mostraram-se potencialmente
3 capazes de produzir micotoxinas.

4 A presença de fungos toxígenos no interior dos galpões caracteriza o ambiente como
5 uma fonte de contaminação para as rações, manipuladores e camarões.

6

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8

9 AKAN, M.; HAZIROGLU, R.; ILHAN, Z.; SAREYYÜPOGLU, B.; TUNCA, R. A case of
10 aspergillosis in a broiler breeder flock. **Avian Diseases**, v.42, n.2, p.497-501, april/june, 2002.

11 BAGATIN, E. ; PEREIRA, C. A. C.; AFIUNE, J. B. Doenças granulomatosas ocupacionais.

12 **J Bras Pneumol.** 2006;32(Supl 2):S87-S102. Disponível em:

13 http://jornaldepneumologia.com.br/PDF/Suple_50_17_11capitulo%2011.pdf, acesso em 21
14 jan. 2008.

15 BAPTISTA, S. A. ; HORII, F. ; BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos
16 ligados à produção de micotoxinas. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 1-14, jan/jun. 2004.

17 BATISTA, L. R. ; FREITAS, R. F. de. Avaliação da produção de aflatoxinas por espécies do
18 fungo *Aspergillus* associados ao café. **Rev. Bras. de Armaz.**, Viçosa, Especial- (1): p. 44-49,
19 2000.

20 BORÉM, F. M. et al. Ocorrência de fungos no ar e em sementes de feijão (*phaseolus vulgari*
21 *L.*) armazenadas em ambientes com equipamento modificador de atmosfera. **Ciênc. agrotec.**,
22 Lavras, v.24, n.1, p.195-202, jan./mar., 2000.

23 BRASIL. Resolução nº 9, de 16 de janeiro de 2003, Aprova a Orientação Técnica Elaborada
24 por Grupo Técnico Acessor sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em
25 Ambientes Climatizados Artificialmente de uso Público e Coletivo. **Diário Oficial da União.**

- 1 Poder Executivo, de 16 de janeiro de 2003. Disponível em: [http://e-](http://e-egis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=17550)
2 [egis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=17550](http://e-egis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=17550). Acesso em 09
3 de junho de 2007.
- 4 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS. Canal do tempo. com. Disponível em
5 <http://br.weather.com/weather/climatology/BRXX2418>> Acesso em 23 de jan. 2008.
- 6 DALCERO, A. et al. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and
7 deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 137, n. 3, p
8 179-184, 1997.
- 9 DI FABIO, J. **Higiene e controle de qualidade no incubatório**. In: *FACTA- Fundação*
10 *Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas*. Curso de atualização em incubação. Ed. Arbor
11 Acres Farm, Inc.Campinas, 1990. p.51-60.
- 12 FILTENBORG. O ; FRISVAD, J. C. A simple screening – method for toxigenic moulds in
13 pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, p. 128-130,
14 1980.
- 15 FONSECA, H. Os fungos e a deterioração de alimentos. Disponível em
16 <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>. > Acesso em 05 maio 200.
- 17 GAVA, M. A. **Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de**
18 **fungos presentes em ambientes de produção de alimentos**. 2002. 65 f. Dissertação
19 (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz,
20 Piracicaba, São Paulo, 2000.
- 21 GIMENO, A. Revision genérica del problema de los hongos y de las micotoxinas en al
22 alimentacion animal. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>.>
23 Acesso em 2 abr. 2000.

- 1 KELLER, K. M. et al. Isolamento e identificação de fungos toxígenos isolados de amostras de
2 rações destinadas à alimentação de eqüinos no estado do Rio de Janeiro. **Rev. Univ. Rural,**
3 **Sér. Ci. Vida.** Seropédica, RJ, EDUR, v. 25, n. 1, Jan.-Jun., p.93-96, 2005.
- 4 KLICH, M.A.; PITT, J.I. *A laboratory guide to the common Aspergillus species and their*
5 *teleomorphs.* **CSIRO** - Division of Food Processing, Australia, 2002, 116p.
- 6 LIN, M. T. ; DIANESE, J. C. A coconut – agar medium rapid detection of aflatoxin
7 production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, p. 1466-1469, 1976.
- 8 MELO, J. T. Avaliação dos níveis de contaminação microbiológica ambiental das diversas
9 áreas de produção do laboratório de fitoterápicos do programa de plantas medicinais da
10 Universidade Federal de Juiz de Fora. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** V.12, n. 2,
11 Abr. 2000, p. 45-50.
- 12 MÍDIO, A. F. ; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos.** São Paulo: Varela, 2000. p.295.
- 13 MOREIRA DA SILVA, R. M. **Especificações microbiológicas para ambientes,**
14 **manipuladores e equipamentos em restaurantes industriais em Minas Gerais.** 1996. 84 f.
15 Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de
16 Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1996.
- 17 PEREIRA, M. M. G. **Pesquisa de fungos produtores de micotoxinas e aflatoxinas em**
18 **alimento animal e aflatoxina M₁ em leite.** 2003. 172 f. Tese (Doutorado em Ciência dos
19 Alimentos) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- 20 PITT, J. I. Guía del laboratorio para la identificación de especies comunes de *Penicillium.*
21 **CSIRO** - Division of Food Processing, Australia, 2004, 199p.
- 22 PITT, J. I & HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage.** Second edition. London: Black
23 Academic & Professional - Chapman & Hall, 1999, 593p.

- 1 ROSA, C. A. R. et al., (2006). “Mycoflora and ochratoxin-producing ability by *Aspergillus*
2 and *Penicillium* species isolated from poultry feed in Brazil”. *Veterinary Microbiology*
3 **113:89-96**).
- 4 SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte.
5 Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- 6 SIQUEIRA JÚNIOR, W. M. et al. Qualidade microbiológica do ar de ambientes de uma
7 indústria de processamento de carnes, avaliadas pelas técnicas da sedimentação em placas e
8 impressão em meio sólido. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n 135, p. 98-102,
9 2005.
- 10 SIGMA STAT for windows version 1.0. Jandel Corporation, 1994.
- 11 SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; RUDE, R. A.; FRANK, J. F. Microbiological monitoring
12 of the food processing environment. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F.;
13 SPECK, M. L. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of**
14 **foods**. 3. ed. Washington: APHA, 1992. cap. 3, p. 51-74.
- 15 TRABULSI, L. R. Et al. **Microbiologia médica**. São Paulo: Atheneu. 2002. 586 p.

16

17 **AGRADECIMENTOS**

18

19 Apoio financeiro: Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico –
20 CNPq, entidade governamental brasileira financiadora do desenvolvimento científico e
21 Tecnológico.

22 Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos, Centro de Ciências
23 Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

- 1 Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas do Departamento de
- 2 Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária da Universidade Federal
- 3 Rural do Rio de Janeiro.

ANEXO

ANEXO 1 Tabela de classificação dos padrões de Sadler

Tabela 1 - Tabela de Sadler.

Classificação	Nº médio de colônias-Bactérias	Nº médio de colônias-fungos
Excelente	0-10	0
Bom	11-25	1-3
Médio	26-46	4-6
Ruim	47-66	7-10
Muito ruim	67-86	11-12
Péssimo	+ de 87	+ de 13

Capítulo II

1 **Fungos toxígenos isolados e identificados em rações utilizadas em carcinicultura**
2 **marinha**

3
4 **Fungi toxigenic isolated and identified in feed used in marine shrimp culture**

5
6 Rodrigo Maciel Calvet^{I*2}; Maria Christina Sanches Muratori^{II}; Maria Marlúcia Gomes
7 Pereira^{II}; Regina Célia de Jesus Fialho^{III}; Aline Marques Monte^{III}, Átyla Peeter Batista
8 Veloso^{III}; Ygor Flávio de Moraes Santos^{III}; Amilton Paulo Raposo Costa^{II}, Kelly Moura
9 Keller^{IV}, Luiz Antônio Moura Keller^{IV}; Carlos Alberto da Rocha Rosa^V

10
11 **RESUMO**

12
13 No litoral piauiense estão localizadas 14 propriedades carcinicultoras que são importantes
14 para o desenvolvimento sócio-econômico da região. A ração é um dos principais custos e para
15 reduzir perdas econômicas, deve ser devidamente estocada para evitar contaminações por
16 microrganismos. Realizou-se a contagem e identificação de fungos em rações de três
17 propriedades carcinicultoras sorteadas randomicamente e identificadas como “A”, “B” e “C”.
18 As coletas foram realizadas nos galpões de estocagem e nos depósitos próximos aos viveiros,
19 coletadas em embalagens de rações fechadas e em uso. Em seguida, foram processadas para a
20 contagem de fungos (ufc/g) pelo método da diluição decimal seriada (10^{-1} a 10^{-3}) em Agar

^IMédico Veterinário, Mestrando em Ciência Animal – CCA/Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil
CEP 64.049-550. e-mail: rodrigocalvet@hotmail.com;

^{II}Docentes Departamento de Morfofisiologia Veterinária – CCA/ Universidade Federal do Piauí;

^{III}Graduandos do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal do Piauí;

^VMédicos Veterinários, Mestrandos em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;

^VProfessor Titular de Micologia e Micotoxicologia – DMIV/IV/ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

^{2*}Autor para correspondência

1 Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol, a 25,0 °C por cinco a sete dias. Foram utilizadas a
2 chave de identificação recomendada por KLICH e PITT (2002) para as cepas dos gêneros
3 *Aspergillus* e *Penicillium*. O potencial toxígeno dos *Aspergillus* isolados foi avaliado no Agar
4 Leite de Coco. As contagens das rações para camarão não diferiram entre si nas propriedades
5 “A” e “B” (1,33 a 2,66 ufc/g log₁₀) em todas as fases de cultivo, independentemente do local
6 de coleta e das condições das embalagens (fechadas ou em uso). As menores contagens
7 fúngicas ocorreram na propriedade “C” (0,65 ufc/g log₁₀) em rações com embalagens íntegras
8 estocadas no viveiro da Fase II. Não houve diferença significativa nas demais contagens tanto
9 no período chuvoso quanto no seco. Os fungos prevalentes pertenceram aos gêneros
10 *Aspergillus* e seus teleomorfos (66,1%) e *Penicillium* (10,7%). Foram identificadas 34 cepas
11 do gênero *Aspergillus*, sendo a maior prevalência de *A. flavus* (38,2%). As rações utilizadas
12 nas diferentes fases de cultivos de carcinicultura apresentaram baixas contagens de fungos
13 (0,65 a 2,66 ufc/g log₁₀), tanto nas rações estocadas em embalagens fechadas quanto nas em
14 uso, durante todo o ano. Algumas espécies de *A. flavus*, *A. niger*, *A. awamori* e *A. terreus*
15 isoladas são potencialmente capazes de produzir micotoxinas.

16 .

17 **Palavras-chave:** *Litopenaeus vannamei*, armazenamento de ração, camarão, fase de cultivo,
18 sazonalidade, microbiologia, boas práticas.

19

20 **ABSTRACT**

21

22 In Piauí coastal are located 14 properties shrimp culture that are important to the socio-
23 economic development of the region. The feed is a major cost and to reduce financial losses,
24 must be properly stored to prevent contamination by microorganisms. It was held on counting
25 and identification of fungi in feed of three properties shrimp culture drawn randomly and

1 identified as "A", "B" and "C". The samples were collected in warehouses, storage depots and
2 in coming to nurseries, collected in packs of rations closed and use. Then were processed for
3 the counting of fungi (cfu/g) by the method of serial dilution decimal (10^{-1} to 10^{-3}) in Agar
4 Dichloran Rose Bengal Chloranphenicol, 25.0 ° C for five to seven days. We used the key of
5 identification recommended by KLICH and PITT (2002) to the strains of the genera
6 *Aspergillus* and *Penicillium*. The toxigenic potential of *Aspergillus* alone has been estimated
7 at Coconut Agar Medium. The counting of feed for shrimp did not differ among on the
8 properties "A" and "B" (1.33 to 2.66 cfu/g \log_{10}) at all stages of cultivation, regardless of the
9 place of collection and the conditions of packaging (closed or in use). The lowest counts
10 fungal occurred on the property "C" (0.65 cfu/g \log_{10}) in feeds with its quality packaging
11 stored in the nursery of Phase II. There was no significant difference in other counts both in
12 the rainy season and in dry. The fungi prevalent belonged to the genera *Aspergillus* and their
13 teleomorphos (66.1%) and *Penicillium* (10.7%). It was identified 34 strains of *Aspergillus*, the
14 most prevalent was *A. flavus* (38.2%). The feed used in the different stages of cultivation of
15 shrimp culture have low counts of fungi (0,65 to 2,66 cfu/g \log_{10}) , both in rations stored in
16 packages and in its quality in use by weather conditions throughout the year. Some species of
17 *A. flavus*, *A. niger*, *A. awamori* and *A. terreus* isolated are potentially capable of producing
18 mycotoxins.

19

20 **Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, storage of feed, shrimp, stage of cultivation, seasonality,
21 microbiology, good practice.

22

1 INTRODUÇÃO

2

3 O litoral piauiense possui 66 quilômetros de extensão e a carcinicultura é uma
4 importante atividade econômica, por gerar divisas e empregos diretos e indiretos para a
5 população local. Nesta região estão implantadas 14 propriedades carcinicultoras que
6 produziram 843 toneladas de camarão em 2006, ocupando o sexto lugar na produção
7 brasileira (ABCC, 2009).

8 A produtividade depende da qualidade dos insumos utilizados, dentre eles a ração que
9 tem elevado custo financeiro. Deste modo, é de fundamental importância, a adoção de
10 mecanismos eficientes para controlar a qualidade dos alimentos fornecidos para os camarões,
11 desde a produção a estocagem nas propriedades camaroneiras. Como medida de controle, os
12 estabelecimentos procuram implementar as Boas Práticas Agropecuárias e o sistema de
13 Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle para evitar a contaminação por
14 microrganismos indesejáveis dentre eles, os fungos e as leveduras (ABCC, 2006).

15 O potencial do Nordeste para o desenvolvimento da carcinicultura coloca esta
16 atividade como uma alternativa viável para acelerar o desenvolvimento do meio rural na faixa
17 costeira, contribuindo na fixação do homem em seu habitat natural e a reversão do êxodo rural
18 (ROCHA, 2007).

19 Na carcinicultura as rações são armazenadas em galpões e em “casas” próximas aos
20 viveiros para facilitar o manejo e devem ser estocadas sob condições de cuidados rigorosos,
21 sobretudo nas regiões de clima quente e úmido, por favorecerem o crescimento de organismos
22 contaminantes, como coliformes, enterobactérias, fungos e leveduras (FAO, 2004).

23 Alguns fungos são capazes de produzir substâncias denominadas micotoxinas e os
24 gêneros de maior importância para o alimento e ração são os *Aspergillus*, *Penicillium* e
25 *Fusarium*. Para ocorrer o crescimento fúngico e produção de micotoxinas é necessário que

1 haja uma série de fatores, como atividade de água (Aa) e temperatura aumentadas, substrato
2 adequado e interações microbianas (PEREIRA, 2003). A contaminação pode ocasionar
3 redução na capacidade de germinação de grãos, perda do valor nutricional e produção de
4 micotoxinas. Tais substâncias são responsáveis por transtornos tanto para a saúde animal
5 quanto para o homem (QUEIROZ, et al., 2005; KELLER, et al., 2005).

6 LIN e DIANESE (1976) desenvolveram um método para identificação de fungos
7 toxígenos, que utiliza o Agar Leite de Coco (CAM), baseado na produção de fluorescência
8 azul-violeta e uma pigmentação específica no meio de cultura na presença de micotoxina. De
9 um modo geral, os métodos utilizados para a detecção de fungos toxígenos baseiam-se na
10 produção de micotoxina, em extrato sólido ou líquido, extração da toxina com solventes
11 orgânicos, purificação, concentração e detecção por Cromatografia de Camada Delgada
12 (FILTENBORG e FRISVAD, 1980).

13 A ração pode ser contaminada por fungos presentes no ambiente, nos ingredientes,
14 pelas instalações da fábrica, pelo transporte e armazenamento inadequado em galpões com
15 infiltração e condensação de água em seu interior (GIMENO, 2000). Os fungos têm sido
16 evidenciados como microrganismos de grande importância para os alimentos, responsáveis
17 por perdas econômicas de relevância, representando uma série de prejuízos em todo mundo
18 (PEREIRA, 2003).

19 A legislação brasileira não estabelece limites para contagem de fungos em ração
20 (BRASIL, 1991), entretanto, fungos filamentosos e leveduras são degradadores e podem
21 produzir micotoxinas em alimentos (ICMSF, 1996), portanto, é necessário estabelecer padrão
22 para contagens fúngicas, para que as rações favoreçam a produção de animais saudáveis.
23 Ressalta-se que a presença de fungos em alimentos e rações não implica na ocorrência de
24 micotoxinas (HUSSEIN E BRASEL, 2001) e que na ausência fúngica pode ocorrer

1 micotoxinas produzidas previamente por fungos inativados, durante o processamento da
2 ração.

3 SMITH E MOSS (1985) apud MARTINS E MARTINS (2001) indicam que rações de
4 boa qualidade microbiológica e seus ingredientes devem ter no máximo 10^5 ufc/g ($5,0 \log_{10}$)
5 de fungos, e rações com valores superiores a $10^{7,5}$ ufc/g ($7,0 \log_{10}$) conferem odor de mofo, e
6 podem conter substâncias zootóxicas.

7 SANTOS, (2006) e CALVET et al (2007) evidenciaram fungos de gêneros variados
8 em rações e galpões de estocagem da carcinicultura piauiense, agravado principalmente pelo
9 armazenamento inadequado da mesma, o que favoreceu o desenvolvimento e multiplicação da
10 microbiota fúngica encontrada.

11 Deste modo, objetivou-se quantificar e identificar a microbiota fúngica toxigênica
12 presente nas rações utilizadas na alimentação de camarões.

13

14 MATERIAL E MÉTODOS

15

16 No período de outubro de 2006 a junho de 2007 foram avaliadas as condições da
17 microbiota fúngica das rações em três das quatorze propriedades carcinicultoras, existentes no
18 litoral piauiense (região delimitada entre $2^{\circ} 55' 51,39''$ S – $2^{\circ} 58' 04,31''$ S a $41^{\circ} 20' 09,35''$ O
19 – $41^{\circ} 26' 33,52''$ O). As propriedades foram selecionadas por sorteio e identificadas para fins
20 de pesquisas como “A”, “B” e “C”. Para amostragem por propriedade foi sorteado um viveiro
21 para cada uma das três fases de cultivo (pós-larva – fase I, juvenil – fase II e engorda – fase
22 III) sendo realizadas seis coletas, totalizando 108 amostras de 1,0 kg de ração.

23 As amostras de ração foram obtidas em esquema fatorial de 3 x 2 (tipos de ração e
24 formas de armazenamento), com seis repetições, cada uma representada por amostras de 1,0
25 kg de ração comercial.

1 A coleta de ração das três fases de cultivo foi realizada no galpão de armazenamento e
2 nos depósitos próximos aos viveiros, a partir de embalagens íntegras e de embalagens em uso,
3 na ocasião eram medidas a temperatura e umidade relativa do ambiente utilizando um
4 termohigrômetro Inconterm[®] portátil. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos
5 estéreis Nasco Whirl-Pak[®] devidamente identificados e em seguida foram transportadas para
6 o Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos e Pesquisa e
7 Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Piauí.

8 Para contagem de fungos filamentosos e leveduras, utilizou-se a metodologia decimal
9 seriada (10^{-1} a 10^{-3}) recomendada por PITT e HOCKING (1999). Foram pesadas
10 assepticamente 25g das amostras diretamente nos frascos contendo 225,0mL de água
11 peptonada tamponada estéril a 0,1% para a obtenção da diluição 10^{-1} . Em seguida foram
12 preparadas diluições decimais até 10^{-3} . De cada diluição, transferiram-se alíquotas de 1,0mL
13 para placas de Petri onde se verteu o Agar Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol. Após
14 solidificação as placas foram incubadas em estufa de cinco a sete dias a $25,0^{\circ}$ C. As placas
15 eram observadas diariamente e selecionando-se as que apresentavam contagens entre 10 a 100
16 unidades formadoras de colônias por grama (ufc/g), de acordo com DALCERO et al., (1997).

17 As colônias fúngicas pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram
18 identificadas utilizando as chaves de identificação descritas por KLICH & PITT (2002),
19 baseadas na semeadura em quatro meios básicos: Czapek yeast extract agar (CYA); malt
20 extract agar (MEA) e Czapek yeast extract agar 20% sucrose (CY20S). Preparou-se uma
21 suspensão de conídios a partir de cada cepa em 0,5 mL de meio constituído de 0,2% de agar-
22 agar e 0,05% de Tween 80TM, distribuído em tubos de hemólise e previamente esterilizados a
23 121° C por 15 minutos (PITT & HOCKING, 1999). A seguir, introduziu-se a agulha de platina
24 na suspensão de conídios transferido-os para três pontos equidistantes nas placas contendo
25 CYA; MEA, CY20S e G25N. Estas placas foram incubadas por sete dias a 25° C. Após a

1 incubação, visando à identificação das espécies, observaram-se suas estruturas
2 micromorfológicas e as características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma,
3 aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios e pigmento solúvel, produção e
4 cor de exsudato). O potencial toxígeno dos *Aspergillus* isolados foi avaliado utilizando o Agar
5 Leite de Coco (CAM) após a inoculação e incubação por sete dias a 25° C. Posteriormente,
6 verificou-se a pigmentação produzida pelo fungo no meio, e a fluorescência através de um
7 cromatovisor com luz ultravioleta de $\lambda = 365\text{nm}$. A fluorescência característica da produção de
8 micotoxina foi expressa com o símbolo (+) para positividade e (-) para negatividade (LIN e
9 DIANESE, 1976).

10 Após a obtenção dos resultados, realizou-se a análise de variância e aplicação do teste
11 de SNK para comparação das médias utilizando o Pacote Estatístico SIGMA STAT (1994).
12 Os resultados foram também correlacionados e transformados em \log_{10} . Para análise das
13 variáveis quantitativas foi utilizado o teste não paramétrico do χ^2 Qui-quadrado (SAMPAIO,
14 2002).

1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2

3 Os resultados referentes às contagens de fungos filamentosos e leveduras em ração de camarão entre as diferentes fases de crescimento
4 estão representados na Tabela 1.

5

6 **Tabela 1** Médias das contagens de fungos filamentosos e leveduras (ufc/g) em rações de camarão nas diferentes fases de crescimento cultivados no
7 litoral piauiense

Propriedades	Fase I				Fase II				Fase III			
	Embalagem no Galpão		Embalagem no Viveiro		Embalagem no Galpão		Embalagem no Viveiro		Embalagem no Galpão		Embalagem no Viveiro	
	Uso	Fechada	Uso	Fechada	Uso	Fechada	Uso	Fechada	Uso	Fechada	Uso	Fechada
A	2,00 ^a	2,10 ^a	1,53 ^a	-	1,33 ^a	1,60 ^a	1,95 ^a	-	1,75 ^a	1,62 ^a	1,67 ^a	1,46 ^a
B	2,66 ^a	2,08 ^a	1,41 ^a	1,68 ^a	1,69 ^a	1,97 ^a	-	1,55 ^a	1,91 ^a	1,97 ^a	-	1,69 ^a
C	-	1,64 ^a	2,32 ^a	2,16 ^a	2,01 ^a	1,67 ^a	1,82 ^a	0,65 ^b	2,01 ^a	1,49 ^a	1,53 ^a	0,75 ^a

8 ab= letras diferentes representam resultados diferentes na mesma linha ($p > 0,05\%$); ufc/g= unidades formadoras de colônias por grama em \log_{10} .

9

10

1 As contagens fúngicas das rações para camarão foram semelhantes nas propriedades
 2 “A” e “B” em todas as fases de cultivo, independentemente do local de coleta e das condições
 3 das embalagens (íntegras ou em uso) como pode ser observado na Tabela 1. As menores
 4 contagens fúngicas ocorreram na propriedade “C” em rações de embalagens íntegras
 5 estocadas no viveiro da Fase II (Tabela 1). Foi possível verificar que as propriedades
 6 adquiriram rações para camarões de todas as fases de crescimento com contaminação fúngica
 7 pré-existentes pelas contagens observadas nas amostras provenientes de embalagens íntegras.
 8 Esta possibilidade foi discutida por GIMENO (2000). Deste modo, a forma de manipulação e
 9 de armazenamento das rações nas propriedades não interferiu nas quantidades fúngicas
 10 isoladas.

11 As amostras de rações analisadas apresentaram valores inferiores a 3,0 ufc/g (Tabelas
 12 1 e 2) indicando boa qualidade microbiológica conforme recomendam SMITH E MOSS
 13 (1985) apud MARTINS E MARTINS (2001). As contagens fúngicas foram semelhantes
 14 ($p>0,05\%$) nas coletas realizadas durante o período chuvoso e seco nas propriedades (Tabela
 15 2), resultados semelhantes foram obtidos por SANTOS (2006).

16 **Tabela 2** Médias das contagens de fungos filamentosos e leveduras (ufc/g) em rações de
 17 camarão no período seco e chuvoso

Propriedades	Período chuvoso (TM= 27 °C, UR = 71,5%)				Período seco (TM= 30,9 °C, UR =62,5%)			
	Embalagem no Galpão		Embalagem no Viveiro		Embalagem no Galpão		Embalagem no Viveiro	
	Uso	Fechada	Uso	Fechada	Uso	Fechada	Uso	Fechada
A	2,06 ^a	1,64 ^a	2,70 ^a	-	1,52 ^a	1,85 ^a	1,25 ^a	-
B	2,04 ^a	1,99 ^a	2,61 ^a	1,64 ^a	2,29 ^a	2,18 ^a	-	1,98 ^a
C	2,01 ^a	1,59 ^a	2,17 ^a	1,56 ^a	1,60 ^a	2,09 ^a	1,48 ^a	2,11 ^a

18 a= Letras iguais na mesma linha e mesma coluna não apresentam diferença $p>0,05\%$; TM=
 19 Temperatura Média; UR= Umidade relativa.

20

1 Durante o período experimental, a temperatura e umidade variaram de 27 °C a 30,9 °C
 2 e 62,5% a 71,5 % no período da seca e chuva respectivamente (Tabela 2). A região possui
 3 clima tropical úmido com médias de umidade e temperatura em 2007 de 69% e 27°C,
 4 respectivamente, e precipitação que variou de 3 a 226 mm (CONDIÇÕES CLIMÁTICAS,
 5 2007). Pelo exposto, apesar do clima observado no litoral piauiense favorecer o
 6 desenvolvimento fúngico, as contagens foram constantes nas embalagens íntegras e em uso
 7 em todas as épocas do ano. Isto se deve a alta rotatividade de estoque das rações, aos baixos
 8 índices de umidade declarados pelos fabricantes (média de 13%) e ao processo de fabricação
 9 de rações utilizadas em carcinicultura e piscicultura.

10 Os fungos prevalentes em rações utilizados na carcinicultura piauiense (Tabela 3)
 11 pertenciam aos gêneros *Aspergillus* e seus teleomorfos (66,1%) e *Penicillium* (10,7%). Os
 12 demais gêneros também têm importância para a qualidade da ração.

13 **Tabela 3** Fungos filamentosos isolados de rações utilizadas na carcinicultura piauiense

Gênero Fúngico	Números de Isolados	Ocorrência (%)
<i>Aspergillus</i> spp. e teleomorfos	37 ^a	66,1
<i>Penicillium</i> spp. e teleomorfos	06 ^b	10,7
Mucorales	05 ^b	8,9
<i>Cladosporium</i> spp.	03 ^b	5,4
<i>Curvularia</i> spp.	03 ^b	5,4
<i>Trichoderma</i> spp.	01 ^b	1,8
<i>Moniliella</i> spp.	01 ^b	1,8
Total	56	100,0

14 ^{a,b} = letras iguais resultados semelhantes na mesma coluna ($p < 0,05$). $\chi^2 = 145,9$.

15 Foram identificadas 34 cepas de *Aspergillus*, a maior prevalência foi de *A. flavus*
 16 (38,2%). Também foram isoladas outras espécies toxígenas importantes como o *A. niger* e *A.*
 17 *versicolor* (Tabela 4). Destas espécies, apenas uma cepa de *A. flavus*, *A. awamori*, *A. niger* e
 18 *A. terreus* apresentaram fluorescência no CAM, indicando que eles possuíam capacidade

1 toxigênica. As demais cepas de *Aspergillus* testadas não apresentaram fluorescência no
 2 cromatovisor, o que não descaracteriza sua capacidade de ser potencialmente toxígeno,
 3 tornando-se necessária a confirmação utilizando o método de Plug Agar conforme
 4 recomendam FILTENBORG e FRISVAD, (1980) e PEREIRA, (2003).

5 **Tabela 4** Espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de rações utilizadas na carcinicultura
 6 piauiense

Seção	Números de Isolados	Ocorrência (%)	Isolados fúngicos com fluorescência
Seção Flavi			
<i>A. flavus</i>	13 ^a	38,2	1(+)
<i>A. oryzae</i>	11 ^a	32,4	-
Seção Nigri			
<i>A.niger</i>	04 ^b	11,8	1(+)
<i>A. awamori</i>	01 ^b	2,9	1(+)
Seção Versicolores			
<i>A. versicolor</i>	03 ^b	8,8	-
Seção Terrei			
<i>A. terreus</i>	01 ^b	2,9	1(+)
Seção Sparsi			
<i>A. sparsus</i>	01 ^b	2,9	-
Total	34	100,00	4(+)

7 ^{a,b} = letras iguais resultados semelhantes na mesma coluna ($p < 0,05$). $\chi^2 = 36,4$.

8 A alta incidência de *A. flavus* observada nas rações para camarões (Tabela 4) indica a
 9 possível presença de aflatoxina (PEREIRA, 2003). Os fungos encontrados nas rações que
 10 estavam estocadas nos galpões em embalagens fechadas podem ser decorrentes da utilização
 11 de matéria-prima contaminada ou ainda, durante sua fabricação, conforme indica GIMENO
 12 (2000). A possível ingestão destas micotoxinas pelos camarões pode acarretar perdas
 13 econômicas por interferir em seu metabolismo sobrecarregando o hepatopâncreas e como
 14 afirmam BOONYARATPALIN et al., (2001), ao submeter rações contaminadas com

1 aflatoxinas para camarões, constataram a presença da mesma na sua musculatura após quatro
2 semanas.

3 SANTOS (2006) ao pesquisar fungos em rações utilizadas na carcinicultura piauiense,
4 evidenciou os seguintes gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Absidia*, *Cladosporium*,
5 *Rhizopus* e *Mucor*. KELLER et al. (2005), ao avaliar rações destinadas a alimentação de
6 equinos, constataram uma prevalência de 36% de *A. flavus* e sugerem um monitoramento
7 micotoxicológico rotineiro das rações. Já PEREIRA (2003) ao analisar rações utilizadas na
8 alimentação animal evidenciou 31 cepas de *A. flavus* das quais 38,71% eram produtoras de
9 aflatoxina B₁ e de aflatoxina B₂. Estes fatos evidenciam a necessidade de pesquisar o potencial
10 micotóxico dos fungos encontrados e a presença de micotoxinas nas rações utilizadas na
11 carcinicultura piauiense.

12

13 CONCLUSÃO

14

15 As rações utilizadas nas diferentes fases de cultivos de carcinicultura apresentaram
16 baixas contagens de fungos, tanto nas rações estocadas em embalagens fechadas quanto nas
17 em uso.

18 As contagens fúngicas não diferiram entre si nas diferentes propriedades analisadas,
19 durante todo o ano, tanto nas rações estocadas em embalagens fechadas quanto nas em uso.

20 Algumas espécies de *A. flavus*, *A. niger*, *A. awamori* e *A. terreus* isoladas de rações
21 utilizadas na carcinicultura piauiense eram potencialmente capazes de produzir micotoxinas
22 que podem ser ingeridas pelos camarões.

23

1 REFERÊNCIAS

2

3 ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Volume das exportações brasileiras
4 de camarão de 2003 – 2007. Disponível em: [http:// http://www.abccam.com.br/estat31.htm](http://www.abccam.com.br/estat31.htm) .
5 Acesso em 28 de maio. 2009.

6 .ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão **Camarões marinho gestão de**
7 **qualidade e rastreabilidade na fazenda.** Disponível em: [http://](http://www.abccam.com.br/censo_2004)
8 www.abccam.com.br/censo_2004>. Acesso em 24 de set. 2006.

9 BOONYARATPALIN, M. et al. Effects of aflatoxin B1 on growth performance, blood
10 components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus*
11 *monodon* Fabricius). **Aquaculture Research**, 2001, 32 (Suppl. 1), 388-398.

12 BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº108 de 04 de setembro de 1991. Aprova os métodos
13 analíticos para controle de alimentos para uso animal: métodos físicos, químicos e
14 microbiológicos. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, seção 1, p. 19813 de 17 de setembro
15 de 1991.

16 CALVET, et al. Fungos filamentosos e leveduras nos galpões de armazenamento de ração em
17 carcinicultura. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HIGIENISTAS DE
18 ALIMENTOS, 3., CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 9.,
19 Porto Seguro, 2007. **Anais...** Porto Seguro: Revista Higiene Alimentar, 2007, v. 21, p. 251-
20 252.

21 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS. Canal do tempo. com. Disponível em
22 <http://br.weather.com/weather/climatology/BRXX2418>> Acesso em 23 de jan. 2008.

23 DALCERO, A. et al. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and
24 deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 137, n. 3, p
25 179-184, 1997.

- 1 FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations 2004**. Disponível em:
2 [http:// www.fao.org](http://www.fao.org)>. Acesso em 09 de dez. 2007.
- 3 FILTENBORG. O ; FRISVAD, J. C. A simple screening – method for toxigenic moulds in
4 pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, p. 128-130,
5 1980.
- 6 GIMENO, A. Revision genérica del problema de los hongos y de las micotoxinas en al
7 alimentacion animal. Disponível em: [http:// www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm](http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm).> Acesso
8 em 2 abr. 2000.
- 9 HUSSEIN, H. H. ; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of micotoxins on
10 humans and animals. **Toxicology**, Clare, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.
- 11 ICMSF. INTERNACIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS
12 FOR FOODS. **Microrganismos de los alimentos**: características de los patógenos
13 microbiano. Zaragoza: Acribia, 1996. p. 403-428.
- 14 KELLER, K. M. et al. Isolamento e identificação de fungos toxígenos isolados de amostras de
15 rações destinadas à alimentação de eqüinos no estado do Rio de Janeiro. **Rev. Univ. Rural,**
16 **Sér. Ci. Vida**. Seropédica, RJ, EDUR, v. 25, n. 1, Jan.-Jun., p.93-96, 2005.
- 17 LIN, M. T. ; DIANESE, J. C. A coconut – agar medium rapid detection of aflatoxin
18 production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, p. 1466-1469, 1976.
- 19 MARTINS, H. M. ; MARTINS, M. L. Qualidade micológica de rações para bovinos
20 (Portugal: 1996-1999). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 37, n. 538, p. 85-
21 88, 2001.
- 22 PEREIRA, M. M. G. **Pesquisa de fungos produtores de micotoxinas e aflatoxinas em**
23 **alimento animal e aflatoxina M₁ em leite**. 2003. 172 f. Tese (Doutorado em Ciência dos
24 Alimentos) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003

- 1 PITT, J. I. ; HOCKING, A. D. **Fungi and spoliage**. 2 ed. London: Blackie academic and
2 Professional, 1999. 593p
- 3 QUEIROZ, et al. Avaliação de substratos vegetais destinados a alimentação animal como
4 suportes para a produção de ochratoxina A por espécies do gênero *Aspergillus* FR. **Rev. Univ.**
5 **Rural, Sér. Ci. Vida**. Seropédica, RJ, EDUR, v. 25, n. 1, Jan.-Jun., p. 64-70, 2005.
- 6 ROCHA, I. P. **Impactos sócio-econômicos e ambientais da carcinicultura brasileira:**
7 **mitos e verdades**. Disponível em: [http:// www.abccam.com.br](http://www.abccam.com.br)>. Acesso em 24 de abr. 2007.
- 8 SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte.
9 Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- 10 SANTOS, F. C. F. **Pesquisa de fungos micotoxígenos em rações e de micotoxina em**
11 **camarões cultivados no litoral do Piauí**. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência
12 Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2006.
- 13 SIGMA STAT for windows version 1.0. Jandel Corporation, 1994.
- 14 SMITH, J. & MAURICE MOSS. **Mycotoxins, Formation, Analysis and Significance**. Ed
15 by John Wiley & Sons. USA, 1985. p – 148.

16

17 **AGRADECIMENTOS:**

18

19 Apoio financeiro: Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico –
20 CNPq, entidade governamental brasileira financiadora do desenvolvimento científico e
21 Tecnológico.

22 Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos, Centro de Ciências
23 Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

- 1 Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas do Departamento de Microbiologia e
- 2 Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de
- 3 Janeiro

Capítulo III

Micobiota toxígena em camarões marinhos cultivados

Mycobiot toxigenic in marine shrimp grown

Rodrigo Maciel Calvet^{I*3}; Maria Christina Sanches Muratori^{II}; Maria Marlúcia Gomes Pereira^{II}; Regina Célia de Jesus Fialho^{III}; Aline Marques Monte^{III}, Átyla Peeter Batista Veloso^{III}; Ygor Flávio de Moraes Santos^{III}; Amilton Paulo Raposo Costa^{II}; Kelly Moura Keller^{IV}, Luiz Antônio Moura Keller^{IV}; Carlos Alberto da Rocha Rosa^V

RESUMO

Os fungos são usados como parâmetros na avaliação microbiológica determinando as condições higiênicas dos locais de coleta. São importantes pela capacidade de produzir micotoxinas ou deteriorar alimentos. Devido a estes fatores, objetivou-se quantificar, isolar e identificar a micobiota toxígena dos camarões marinhos cultivados no litoral piauiense. Quatro das quatorze propriedades carcinicadoras existentes no litoral do Piauí foram selecionadas randomicamente e identificadas como “A”, “B”, “C” e “D” para coletas de amostras de camarão das três fases de cultivo em delineamento fatorial 4x3 (quatro propriedades e três fases) representado por três amostras de 100g de camarão, totalizando 84 amostras que foram identificadas e processadas para contagem de fungos pela metodologia

^IMédico Veterinário, Mestrando em Ciência Animal – CCA/Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil CEP 64.049-550. e-mail: rodrigocalvet@hotmail.com;

^{II} Docentes Departamento de Morfofisiologia Veterinária – CCA/ Universidade Federal do Piauí;

^{III} Graduandos do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal do Piauí;

^{IV} Médicos Veterinários, Mestrandos em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;

^V Professor Titular de Micologia e Micotoxicologia – DMIV/IV/ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

*Autor para correspondência

1 decimal seriada utilizando placas de Petri contendo o Agar Dichloran Rose Bengal
2 Cloranfenicol e incubadas em estufa por cinco a sete dias a 25,0° C. O potencial toxígeno dos
3 *Aspergillus* isolados foi avaliado no Agar Leite de Coco. Não houve variação nas contagens
4 de fungos entre as fazendas pesquisadas em camarão nas diferentes fases de cultivo (1,82 a
5 2,73 ufc/g log₁₀). A identificação das cepas fúngicas pertencentes ao gênero *Aspergillus*
6 seguiram as chaves de identificação de KLICH e PITT, (2002). Isolou-se 64 cepas de sete
7 gêneros fúngicos. Os fungos prevalentes pertenceram aos gêneros *Aspergillus* (34,4%) e
8 *Penicillium* (25,0%). Foram identificadas dezoito cepas do gênero *Aspergillus*. O *A.*
9 *ochraceus*, *A. terreus*, *A. awamori*, *A. niger* e *A. flavus* apresentaram fluorescência positiva no
10 CAM. Os camarões cultivados recém capturados apresentam baixas contagens de fungos. As
11 espécies de *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. awamori*, *A. niger* e *A. flavus* isoladas em camarões
12 apresentaram capacidade toxígena.

13

14 PALAVRAS-CHAVE: *Litopenaeus vannamei*, contagens, fungos, carcinicultura, micotoxinas

15

16 **ABSTRACT**

17

18 The fungi are used as parameters in microbiological evaluation showing the hygienic
19 conditions of places of gathering. They are important for the ability to produce mycotoxins or
20 foods deteriorate. With these factors, it was aimed to quantify, isolate and identify the toxic
21 mycobiota of marine shrimp grown in the Piauí coast. Four of the fourteen shrimp culture
22 existing properties on the coast of Piauí were randomly selected and identified as "A", "B",
23 "C" and "D" for collection of samples of the three stages of shrimp cultivation in 4x3 factorial
24 design (four properties and three phases) represented by three samples of 100g of shrimp,

1 totaling 84 samples that were identified and processed for counts of fungi it was use the
2 methodology decimal series of Petri plates containing the agar Dichloran Rose Bengal
3 Chloranphenicol and incubated in oven for five to seven days to 25.0° C. The potential
4 toxigenic of *Aspergillus* alone has been estimated at Coconut Medium Agar. There was no
5 variation in the counts of fungi from the farms surveyed in shrimp at different stages of
6 cultivation (1.82 to 2.73 ufc/g log₁₀). The identification of the fungal strains belonging to the
7 genera *Aspergillus* followed the keys od identification by KLICH and PITT (2202). It found
8 64 strains of seven fungal genera. The fungi prevalent belonged to the genera *Aspergillus*
9 (34.4%) and *Penicillium* (25.0%). There were identified eighteen strains of the genus
10 *Aspergillus*. The *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. awamori*, *A. niger*, and *A. flavus* showed
11 positive fluorescence in CAM.. The newly cultivated shrimp caught have low counts of fungi.
12 The species *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. awamori*, *A. niger* and *A. flavus* isolated in shrimp
13 had capacity toxigenic.

14

15 **KEYWORDS:** *Litopenaeus vannamei*, count, fungi, shrimp culture, mycotoxins

16

17 **INTRODUÇÃO**

18

19 O Brasil produziu 65.000 toneladas de camarão em 2006, dos quais 843 toneladas
20 foram provenientes da carcinicultura piauiense garantindo o sexto lugar no ranking nacional
21 (ABCC, 2009).

22 A carcinicultura marinha foi introduzida no Piauí na década de 80, com a implantação
23 de fazendas em 550 hectares no litoral. Na ocasião, a espécie mais cultivada foi o *Paneus*
24 *japonicus* amplamente difundida na Ásia e apresentando elevada produtividade, mas os

1 resultados não corresponderam às expectativas esperadas porque o camarão não se adaptou às
2 condições locais, pela falta de infra-estrutura, a falhas técnicas e gerenciais dos
3 empreendimentos. A partir da década de 90 o *Litopenaeus vannamei* foi introduzido na região
4 tornando-se um marco para a carcinicultura piauiense (MORAES, 2001), considerada como
5 uma das mais importantes espécies para o desenvolvimento da carcinicultura.

6 Entretanto, doenças bacterianas, virais e fúngicas podem comprometer o
7 desenvolvimento do setor. Fungos são amplamente distribuídos na natureza por este motivo
8 podem ser usados como parâmetro na avaliação microbiológica determinando as condições
9 higiênicas do ambiente de cultivo.

10 A pesquisa de fungos em alimentos é importante pela capacidade de produzir
11 micotoxinas ou causar deterioração (ICMSF, 1996), no entanto, a RDC nº 12 de 02 de janeiro
12 de 2001, não estabelece valores para a quantificação destes microrganismos em camarões nem
13 para a maioria dos alimentos de origem animal (BRASIL, 2001). Já a Portaria nº 451
14 revogada, possuía parâmetros para bolores e leveduras para diversos alimentos, onde os níveis
15 de aceitação de contagens oscilavam entre 10^3 a 10^5 ufc/g ou mL (BRASIL, 1997).

16 Por este motivo as contagens fúngicas não são mais realizadas como rotina para a
17 avaliação da qualidade de alimentos, especialmente em produtos de origem animal. Assim,
18 produtos que tenham carga fúngica elevada podem ser comercializados e podem comprometer
19 a saúde do consumidor pela presença de micotoxinas (BATISTA e FREITAS, 2000; MIDIO e
20 MARTINS, 2000; BAPTISTA, 2004). As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos
21 com baixo peso molecular que possuem efeitos carcinogênicos, teratogênicos, podendo causar
22 convulsões, alucinações e hemorragias. Os gêneros de maior importância para o alimento por
23 serem produtores deste metabólito são os *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (PEREIRA,
24 2003).

1 REIS et al. (2004) obtiveram contagens de fungos filamentosos e leveduras em
2 camarões frescos de água doce comercializados *in natura* sem gelo que variaram de 5,11 a
3 7,68 ufc/g. Eles justificaram estes resultados às variações de temperatura características das
4 regiões tropicais e subtropicais e também a contaminação da água.

5 LIN e DIANESE (1976) desenvolveram um método para identificação de fungos
6 micotóxicos, que utiliza o Agar Leite de Coco (CAM), baseado na produção de
7 fluorescência azul-violeta e uma pigmentação específica no meio de cultura na presença de
8 micotoxina.

9 De um modo geral, os métodos utilizados para a detecção de fungos toxígenos
10 baseiam-se na produção de micotoxina em extrato sólido ou líquido, extração da toxina com
11 solventes orgânicos, purificação, concentração e detecção por Cromatografia de Camada
12 Delgada (CCD), conforme descrito por FILTENBORG e FRISVAD (1980).

13 De acordo com VILLARREAL-CAVAZOS et al. (2004) embora tenham poucos
14 estudos sobre micotoxinas em camarões peneideos, este metabólito pode afetar o
15 hepatopâncreas, órgãos mandibulares, hematopoiético e a glândula antenal, e por isso, alterar
16 a velocidade de crescimento pela redução da conversão alimentar e do peso comercial
17 (BOONYARATPALIN, et al., 2001).

18 A carcinicultura é uma atividade em expansão no litoral piauiense e os camarões
19 produzidos são congelados para distribuições no mercado interno e externo, para ser
20 consumido das mais diversas formas, inclusive cru. Portanto, as condições higiênicas e
21 sanitárias dos camarões devem ser avaliadas para verificar a segurança do produto
22 comercializado. Deste modo, neste trabalho objetivou-se quantificar, isolar e identificar
23 fungos toxígenos em camarões cultivados no litoral do Piauí.

24

1 MATERIAL E MÉTODOS

2

3 Foram selecionadas randomicamente, quatro das 14 propriedades carcinicultoras
4 existentes no litoral do Piauí (região delimitada entre 2° 55' 51,39''S – 2° 58' 04,31''S a 41°
5 20' 09,35''O – 41° 26' 33,52''O), e identificadas para fins de pesquisa como “A”, “B”, “C” e
6 “D” onde se coletou amostras de camarão das três fases de cultivo: “I” (pós-larva₈ – PL₈ a
7 PL₁₈), “II” (PL₁₈ a 90 dias) e “III” (90 a 120 dias) em delineamento fatorial 4x3 (quatro
8 propriedades e três fases) representado por três amostras de 100g de camarão, totalizando 84
9 amostras.

10 Após as coletas as amostras eram armazenadas em sacos plásticos estéreis Nasco
11 Whirl-Pak[®] lacradas, identificadas e transportadas em recipientes isotérmicos contendo gelo
12 reciclável até o Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos,
13 Pesquisa e Processamentos de Alimentos da Universidade Federal do Piauí para contagem de
14 fungos, pela metodologia decimal seriada (10^{-1} a 10^{-3}) recomendada por PITT e HOCKING
15 (1999). Foram pesadas assepticamente 25g das amostras diretamente nos frascos contendo
16 225,0mL de água peptonada tamponada estéril a 0,1% para a obtenção da diluição 10^{-1} . Em
17 seguida foram preparadas diluições decimais até 10^{-3} . De cada diluição foram transferidas
18 alíquotas de 1,0mL para placas de Petri onde se verteu o Agar Dichloran Rose Bengal
19 Cloranfenicol. Após solidificação as placas foram incubadas em estufa por cinco a sete dias a
20 25,0° C e eram observadas diariamente, selecionando-se as que apresentavam contagens entre
21 10 a 100 unidades formadoras de colônias por grama (ufc/g) (DALCERO et al., 1997).

22 As colônias fúngicas pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram
23 identificadas utilizando as chaves de identificação descritas por KLICH & PITT (2002),
24 baseadas na sementeira em quatro meios básicos: Czapek yeast extract agar (CYA); malt

1 extract agar (MEA) e Czapek yeast extract agar 20% sucrose (CY20S). Preparou-se uma
2 suspensão de conídios a partir de cada cepa em 0,5 mL de meio constituído de 0,2% de agar-
3 agar e 0,05% de Tween 80TM, distribuído em tubos de hemólise e previamente esterilizados a
4 121°C por 15 minutos (PITT & HOCKING, 1999). A seguir, introduziu-se a agulha de platina
5 na suspensão de conídios transferido-os para três pontos equidistantes nas placas contendo
6 CYA; MEA, CY20S e G25N. Estas placas foram incubadas por sete dias a 25° C. Após a
7 incubação, visando à identificação das espécies, observaram-se suas estruturas
8 micromorfológicas e as características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma,
9 aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios e pigmento solúvel, produção e
10 cor de exsudato).

11 O potencial toxígeno dos *Aspergillus* isolados foi avaliado utilizando o Agar Leite de
12 Coco (CAM) após a inoculação e incubação por sete dias a 25° C. Posteriormente, verificou-
13 se a pigmentação produzida pelo fungo no meio, e a fluorescência através de um cromatovisor
14 com luz ultravioleta de $\lambda = 365\text{nm}$. A fluorescência característica da produção de micotoxina
15 foi expressa com o símbolo (+) para positividade e (-) para negatividade (LIN e DIANESE,
16 1976).

17 Após a obtenção dos resultados, realizou-se a análise de variância e aplicação do teste
18 de SNK para comparação das médias de contagens fúngicas utilizando o Pacote Estatístico
19 SIGMA STAT (1994). Os resultados foram também correlacionados e transformados em
20 \log_{10} . Para análise das variáveis qualitativas foi utilizado o teste não paramétrico do χ^2 Qui-
21 quadrado (SAMPAIO, 2002).

22

1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2

3 Os resultados obtidos durante a fase experimental estão resumidos em tabelas que
4 serão apresentadas a seguir. As contagens fúngicas dos camarões das fazendas pesquisadas
5 não diferiram entre si em todas as fases de cultivo (Tabela 1). Estas fases são caracterizadas
6 em função do crescimento e ganho de peso dos animais.

7 Os camarões analisados eram recém capturados, bem nutridos, sadios e possuíam boa
8 imunidade. As baixas contagens fúngicas observadas nas diferentes fases de cultivo (Tabela
9 1) podem estar relacionadas a diversos fatores, dentre eles: o equilíbrio da microbiota externa
10 do corpo do animal e ao tempo decorrido entre a coleta das amostras até a análise. Porém,
11 existe a possibilidade dos fungos presentes nos camarões multiplicarem-se após a despesca e
12 durante o processamento do produto, caso seja armazenado em temperatura inadequada, pois
13 ao encontrarem condições ideais, os fungos possuem um importante papel no processo de
14 deterioração ocasionando perdas da qualidade do produto final e produção de micotoxinas
15 como afirmam a INTERNACIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL
16 SPECIFICATIONS FOR FOODS, (1996).

17 **Tabela 1** Médias das contagens de fungos nos camarões produzidos no litoral piauiense em
18 três fases de cultivo

Fases de Cultivo	Propriedades			
	“A”	“B”	“C”	“D”
I	2,73 ^a	1,85 ^a	2,40 ^a	2,13 ^a
II	2,38 ^a	2,01 ^a	1,98 ^a	2,11 ^a
III	2,65 ^a	1,82 ^a	2,03 ^a	1,85 ^a

19 ^a = letras iguais representam resultados semelhantes (p<0,05); ufc/g = unidade formadoras de
20 colônias por grama em log₁₀.

1 A legislação vigente não possui parâmetros para a quantificação de fungos e leveduras
 2 para pescado (BRASIL, 2001), por isso não se podem comparar os resultados encontrados a
 3 padrões de referência. No entanto as contagens fúngicas nos camarões das diferentes fases
 4 recém despescados é relativamente baixa quando comparada aos resultados de REIS et al.
 5 (2004) e a manipulação indevida posterior a despesca pode acrescentar novos microrganismos
 6 contaminantes, assim como favorecer o desenvolvimento de fungos pré-existentes.

7 Foram isoladas 64 cepas de fungos pertencentes a sete gêneros (Tabela 2) nas amostras
 8 de camarão das diferentes fases de cultivo. As espécies prevalentes pertenciam aos gêneros
 9 *Aspergillus* (34,4%) e *Penicillium* (25,0%). REIS, et al. (2004) afirmam que camarões podem
 10 ser contaminados por fungos pela água do ambiente, no caso dos rios. A contaminação
 11 fúngica observada nos camarões cultivados no litoral piauiense pode ter ocorrido pela
 12 presença destes fungos na ração contaminada que se adaptou as condições de cultivo pela sua
 13 ampla difusão na natureza.

14 **Tabela 2** Fungos filamentosos isolados de camarões cultivados no litoral piauiense

Gênero Fúngico	Números de Isolados	Ocorrência (%)
<i>Aspergillus</i> spp	22 ^a	34,4
<i>Penicillium</i> spp	16 ^a	25,0
<i>Trichoderma</i> spp	09 ^b	14,1
<i>Cladosporium</i> spp	08 ^b	12,5
<i>Fusarium</i> spp	02 ^b	3,1
<i>Alternaria</i> spp	02 ^b	3,1
<i>Curvularia</i> spp	02 ^b	3,1
Total	64	100,0

15 ^{a,b} = letras iguais resultados semelhantes na mesma coluna ($p < 0,05$). $\chi^2 = 148,36$.

16

1 Foram identificadas dezoito cepas do gênero *Aspergillus*, pertencentes às seções
 2 Circundati, Terrei, Nigri e Flavi. As espécies isoladas estão descritas na Tabela 3. Destas
 3 espécies *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. awamori* e *A. niger* apresentaram fluorescência no CAM,
 4 indicando que eles possuíam capacidade toxigênica. As cepas de *A. flavus*, *A. japonicus* e de
 5 *A. oryzae* não apresentaram fluorescência no cromatovisor, o que não descaracteriza sua
 6 capacidade de ser potencialmente toxígeno, tornando-se necessária a confirmação utilizando o
 7 método de Plug Agar conforme recomendam FILTENBORG e FRISVAD, (1980) e
 8 PEREIRA, (2003).

9 **Tabela 3** Espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de camarões cultivados no litoral piauiense.

Seção	Números de Isolados	Ocorrência (%)	Isolados fúngicos com fluorescência
Seção Circundati			
<i>A. ochraceus</i>	04 ^a	22,2	2(+)
Seção Terrei			
<i>A. terreus</i>	04 ^a	22,2	3(+)
Seção Nigri			
<i>A. awamori</i>	03 ^a	16,7	3 (+)
<i>A. niger</i>	02 ^a	11,1	2 (+)
<i>A. japonicus</i>	02 ^a	11,1	-
Seção Flavi			
<i>A. flavus</i>	02 ^a	11,1	-
<i>A. oryzae</i>	01 ^a	5,6	-
Total	18	100,0	10(+)

10 ^a = letras iguais resultados semelhantes na mesma coluna (P<0,05). $\chi^2=3,89$; (-)=
 11 Fluorescência negativa.

12

13 Durante a despesca dos viveiros os camarões são transferidos para recipientes
 14 contendo água do canal de abastecimento, metabissulfito de sódio e gelo para manter a
 15 temperatura próxima a 0,0°C. Em seguida estes depósitos são conduzidos para a indústria

1 onde os camarões são lavados com água clorada a 5,0 ppm, congelados a -35°C e
2 armazenados a -20°C até expedição. A concentração de cloro utilizada é eficiente como
3 bactericida, entretanto, não há comprovação da eficácia em fungos presentes em camarões.

4 Os sulfitos podem ser utilizados como fungicidas para fungos fitopatógenos
5 produtores de esclerócitos (PATSOUKIS e GEORGIU 2007) e as temperaturas utilizadas
6 durante o processamento dos camarões inibe o desenvolvimento dos fungos e sua conseqüente
7 produção de micotoxinas (JAY, 2005).

8 As amostras de camarão analisadas apresentaram espécies de fungos micotoxígenos
9 que caso não sejam adotadas medidas que inibam seus desenvolvimentos no produto
10 armazenado podem se multiplicar posteriormente e produzir micotoxinas. A presença destas
11 espécies no camarão, não indica necessariamente a existência de micotoxinas, pois para isso,
12 é preciso que o fungo encontre condições ideais para seu crescimento. Entretanto, os
13 camarões podem conter micotoxinas no hepatopâncreas pela ingestão de rações previamente
14 contaminadas.

15 As rações contaminadas por fungos micotoxígenos pré-existent na matéria prima são
16 consideradas como fontes de micotoxinas em carcinicultura. Isto se deve ao fato das rações
17 possuírem substratos potenciais para crescimento fúngico e produção destes metabólitos
18 quando são armazenadas expostas a fatores ambientais. Os fungos também podem contaminar
19 os camarões cultivados e interferir na qualidade do produto final e na vida de prateleira pela
20 sua capacidade proteolítica.

21 No entanto, não existem padrões referenciais quanto à prevalência de fungos
22 micotoxígenos em alimentos, necessitando um aprofundamento nas pesquisas com intuito de
23 se verificar a potencialidade destas espécies e a possível presença de micotoxinas em
24 camarões cultivados.

25

1 CONCLUSÃO

2

3 Os camarões cultivados no litoral piauiense quando recém capturados apresentaram
4 baixas contagens fúngicas em todas as fases de cultivo.

5 Os fungos prevalentes nos camarões cultivados pertenceram aos gêneros *Aspergillus*
6 spp e *Penicillium* spp. Também foram isolados os gêneros *Trichoderma* spp, *Cladosporium*
7 spp, *Fusarium* spp, *Alternaria* spp e *Curvularia* spp.

8 As espécies *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. awamori*, *A. níger* e *A. flavus* isoladas em
9 camarões apresentaram capacidade toxígena.

10

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12

13 ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão. **Volume das exportações**
14 **brasileiras de camarão de 2003 – 2007**. Disponível em: [http://](http://www.abccam.com.br/estat31.htm)
15 <http://www.abccam.com.br/estat31.htm> . Acesso em 28 de maio. 2009.

16 BAPTISTA, S. A. ; HORII, F. ; BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos
17 ligados à produção de micotoxinas. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 1-14, jan/jun. 2004.

18 BATISTA, L. R. ; FREITAS, R. F. de. Avaliação da produção de aflatoxinas por espécies do
19 fungo *Aspergillus* associados ao café. **Rev. Bras. de Armaz.**, Viçosa, Especial- (1): p. 44-49,
20 2000.

21 BOONYARATPALIN, M. et al. Effects of aflatoxin B1 on growth performance, blood
22 components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus*
23 *monodon* Fabricius). **Aquaculture Research**, 2001, 32 (Suppl. 1), 388±398.

- 1 BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RDC n.12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o
2 regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**.
3 Brasília-DF, n.7 - E, seção 1, p.45 - 53, 10 de janeiro de 2001.
- 4 BRASIL Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997, Aprova o Regulamento Técnico
5 Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para
6 Alimentos e seus Anexos I, II e III D.O.U. - **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 22
7 de setembro de 1997, Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php> Acesso em
8 16 de março 2007.
- 9 DALCERO, A. et al. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and
10 deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 137, n. 3, p
11 179-184, 1997.
- 12 FILTENBORG. O ; FRISVAD, J. C. A simple screening – method for toxigenic moulds in
13 pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, p. 128-130,
14 1980.
- 15 ICMSF. INTERNACIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS
16 FOR FOODS. **Microrganismos de los alimentos**: características de los patógenos
17 microbiano. Zaragoza: Acribia, 1996. p. 403-428.
- 18 JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2005. 711 p.
- 19 KLICH, M. A. ; PITT, J. I. *A laboratory guide to the common Aspergillus species and their*
20 *teleomorphs*. **CSIRO** - Division of Food Processing, Australia, 2002, 116p.
- 21 LIN, M. T. ; DIANESE, J. C. A coconut – agar medium rapid detection of aflatoxin
22 production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, p. 1466-1469, 1976.
- 23 MÍDIO, A. F. ; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. p.295.

- 1 MORAES, A. M. Agronegócio do camarão no Piauí. **Carta CEPRO**, Teresina, v. 20, n. 3, p.
2 7-12, 2001.
- 3 PATSOUKIS, N ; GEORGIU, C. D. Effect of sulfite–hydrosulfite and nitrite on thiol redox
4 state, oxidative stress and sclerotial differentiation of filamentous phytopathogenic fungi.
5 **Pesticide Biochemistry and Physiology**. Volume 88, Issue 2, June 2007, Pages 226-235.
- 6 PEREIRA, M. M. G. **Pesquisa de fungos produtores de micotoxinas e aflatoxinas em**
7 **alimento animal e aflatoxina M₁ em leite**. 2003. 172 f. Tese (Doutorado em Ciência dos
8 Alimentos) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- 9 PITT, J. I. ; HOCKING, A. D. **Fungi and spoliage**. 2 ed. London: Blackie academic and
10 Professional, 1999. 593p.
- 11 REIS, J. A. et al. Estudo higiênico-sanitário dos camarões dulcícolas *Macrobrachium*
12 *amazonicum* e *M. jelskii*. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 116/117, p. 58-57,
13 2004.
- 14 SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte.
15 Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- 16 SIGMA STAT for windows version 1.0. Jandel Corporation, 1994.
- 17 VILLARREAL-CAVAZOS, et al. Efecto de las micotoxinas em la nutrición de camarones
18 peneidos. In: MEMORIAS DEL SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN
19 ACUÍCOLA, 7., AVANCES EM NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 7., Hermosillo, 2004. **Anais...**
20 Hermosillo, 2004, p. 463-479.
- 21

1 **AGRADECIMENTOS**

2

3 Apoio financeiro: Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico –
4 CNPq, entidade governamental brasileira financiadora do desenvolvimento científico e
5 Tecnológico.

6 Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos, Centro de Ciências
7 Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

8 Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas do Departamento de
9 Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária da Universidade Federal
10 Rural do Rio de Janeiro.

CONCLUSÕES FINAIS

No ambiente de galpões de carcinicultura piauiense estavam presentes fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Byssoclamis* e *Alternaria* que são potencialmente micotoxígenos em quantidades variadas, caso as condições ambientais de umidade relativa e de temperatura do interior dos galpões para estocagem de ração sejam propícias ao desenvolvimento de fungos.

As espécies de *A. niger*, *A. awamori*, e *A. flavus* isoladas do ambiente interno dos galpões de armazenamento de rações em carcinicultura piauiense são potencialmente capazes de produzir micotoxinas caracterizando o ambiente como uma fonte de contaminação para as rações, manipuladores e camarões.

As rações utilizadas nas diferentes fases de cultivos da carcinicultura piauiense apresentaram baixas contagens de fungos, tanto nas rações estocadas em embalagens íntegras quanto nas em uso. Isto se deve as condições climáticas do litoral do Piauí que favoreceram contagens fúngicas semelhantes em rações para camarões durante todo o ano.

Algumas espécies de *A. flavus*, *A. niger*, *A. awamori* e *A. terreus* isoladas de rações utilizadas são potencialmente capazes de produzir micotoxinas que podem ser ingeridas pelos camarões e prejudicar seu desenvolvimento.

Os camarões cultivados no litoral piauiense quando recém capturados apresentaram baixas contagens fúngicas em todas as fases de cultivo.

Os fungos prevalentes nos camarões cultivados pertenceram aos gêneros *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp. Também foram isolados os gêneros *Trichoderma* spp, *Cladosporium* spp, *Fusarium* spp, *Alternaria* spp e *Curvularia* spp

As espécies *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. awamori*, *A. níger* e *A. flavus* isoladas em camarões são potencialmente capazes de produzir micotoxinas

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A carcinicultura marinha é uma atividade em plena expansão mundial gerando recursos, divisas e empregos onde é implantada. Para continuar se expandindo, é necessário que sejam desenvolvidas pesquisas e novas tecnologias para assegurar o desenvolvimento desta atividade. Deste modo são inúmeras as pesquisas em prol da carcinicultura como atividade econômica, lucrativa e benéfica para países em desenvolvimento.

Os resultados apresentados nestes trabalhos vêm acrescentar informações válidas para o desenvolvimento da carcinicultura piauiense e também mundial, pois se sabe da importância dos fungos e suas micotoxinas nas rações e no desenvolvimento dos camarões. No entanto necessita-se que sejam recomendadas sugestões para futuras pesquisas que possam contribuir para o pleno desenvolvimento da carcinicultura. Dentre elas temos:

- I- Avaliar se a implantação das “Boas Práticas Agropecuárias” nas fazendas carcinicultoras com treinamento periódico de toda mão-de-obra, pode contribuir para o controle de fungos toxígenos em todos os setores da produção;
- II- Controlar as condições climáticas e ambientais do interior dos galpões de armazenamento das rações, evitando entrada e fluxo de pessoas e de animais domésticos;
- III- Realizar análises microbiológicas, micotoxicológicas e bromatológicas periodicamente das rações;
- IV- Realizar análises microbiológicas dos efluentes dos viveiros antes de serem lançados; nos estuários e a implantação de um sistema de tratamento destas águas e evitar a disseminação de microrganismos no ambiente;

- V- As propriedades devem adquirir rações de empresas reconhecidas e legalizadas por órgão fiscais oficiais e;
- VI- As empresas que fabricam e fornecem rações para carcinicultura, devem implantar no fluxograma de processamento de rações, o sistema de Boas Práticas de Fabricação e o sistema de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle, assim como adquirir matéria-prima de procedência segura e o mínimo de contaminantes ambientais, assegurando deste modo, produtos seguros e de qualidade;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão **Camarões marinho gestão de qualidade e rastreabilidade na fazenda.** Disponível em: http://www.abccam.com.br/censo_2004>. Acesso em 24 de set. 2006.
- ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão. **Volume das exportações brasileiras de camarão de 2003 – 2007.** Disponível em: <http://www.abccam.com.br/estat31.htm> . Acesso em 28 de maio. 2009.
- AKAN, M.; HAZIROGLU, R.; ILHAN, Z.; SAREYYÜPOGLU, B.; TUNCA, R. A case of aspergillosis in a broiler breeder flock. **Avian Diseases**, v.42, n.2, p.497-501, april/june, 2002.
- BAGATIN, E. ; PEREIRA, C. A. C.; AFIUNE, J. B. Doenças granulomatosas ocupacionais. **J Bras Pneumol.** 2006;32(Supl 2):S87-S102. Disponível em: http://jornaldepneumologia.com.br/PDF/Suple_50_17_11capitulo%2011.pdf, acesso em 21 jan. 2008.
- BAPTISTA, S. A. ; HORII, F. ; BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 1-14, jan/jun. 2004.
- BATISTA, L. R. ; FREITAS, R. F. de. Avaliação da produção de aflatoxinas por espécies do fungo *Aspergillus* associados ao café. **Rev. Bras. de Armaz.**, Viçosa, Especial- (1): p. 44-49, 2000.
- BHAT, R. V. ; VASANTHI. Contaminación por micotoxinas de alimentos y piensos: situación general, incidencia y efectos económicos sobre la disponibilidad de alimentos, comercio, exposición de los animales de granja y pérdidas económicas conexas. **Lista da Terceira Conferência Internacional Mixta FAO/OMS/PNUMA sobre Micotoxinas.** Mar. 1999.

BOONYARATPALIN, M. et al. Effects of aflatoxin B1 on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). **Aquaculture Research**, 2001, 32 (Suppl. 1), 388-398.

BORÉM, F. M. et al. Ocorrência de fungos no ar e em sementes de feijão (*phaseolus vulgaris* L.) armazenadas em ambientes com equipamento modificador de atmosfera. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.24, n.1, p.195-202, jan./mar., 2000.

BRASIL. Resolução nº 9, de 16 de janeiro de 2003, Aprova a Orientação Técnica Elaborada por Grupo Técnico Acessor sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em Ambientes Climatizados Artificialmente de uso Público e Coletivo. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, de 16 de janeiro de 2003. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=17550. Acesso em 09 de junho de 2007.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RDC n.12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, n.7 - E, seção 1, p.45 - 53, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997, Aprova o Regulamento Técnico Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus Anexos I, II e III D.O.U. - **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 22 de setembro de 1997, Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php> Acesso em 16 de março 2007.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº108 de 04 de setembro de 1991. Aprova os métodos analíticos para controle de alimentos para uso animal: métodos físicos, químicos e microbiológicos. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, seção 1, p. 19813 de 17 de setembro de 1991.

CALVET, et al. Fungos filamentosos e leveduras nos galpões de armazenamento de ração em carcinicultura. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 3., CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 9., Porto Seguro, 2007. **Anais...** Porto Seguro: Revista Higiene Alimentar, 2007, v. 21, p. 251-252.

CARVALHO, E. C. Q. Micotoxinas e alimentos: implicações na saúde humana e animal. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v. 2, p. 27-31, 1995.

CONDIÇÕES CLIMÁTICAS. Canal do tempo. com. Disponível em <http://br.weather.com/weather/climatology/BRXX2418>> Acesso em 23 de jan. 2008.

DALCERO, A. et al. Mycroflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 137, n. 3, p. 179-184, 1997.

DETROY, R. W. ; LILLEHOJ, E.B. ; CIEGLER, A. Aflatoxina and related compounds. In: - **Microbial toxins**, v. 6, A. CIEGLER; S. KADS; S. J. AJL, New York, Academic prees, p. 3-178, 1971.

DI FABIO, J. **Higiene e controle de qualidade no incubatório**. In: *FACTA- Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas*. Curso de atualização em incubação. Ed. Arbor Acres Farm, Inc.Campinas, 1990. p.51-60.

FAO. **Fishery Information, Data and Statistics Unit. FishStat plus: universal software for fishery statistical time series**. Version 2.3. Rome, 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp> . Acesso em: 6 maio 2008.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations 2004**. Disponível em: <http://www.fao.org>>. Acesso em 09 de dez. 2007.

FILTENBORG, O ; FRISVAD, J. C. A simple screening – method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, p. 128-130, 1980.

FONSECA, H. **Os fungos e a deterioração de alimentos**. Disponível em <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>. > Acesso em 05 maio 200.

GAVA, M. A. **Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos**. 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, São Paulo, 2000.

GIMENO, A. **Revision genérica del problema de los hongos y de las micotoxinas en al alimentacion animal**. Disponível em: [http:// www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm](http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm).> Acesso em 2 abr. 2000.

HUSSEIN, H. H. ; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of micotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Clare, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

ICMSF. INTERNACIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microrganismos de los alimentos**: características de los patógenos microbiano. Zaragoza: Acribia, 1996. p. 403-428.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2005. 711 p.

KELLER, K. M. et al. Isolamento e identificação de fungos toxígenos isolados de amostras de rações destinadas à alimentação de equinos no estado do Rio de Janeiro. **Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Vida**. Seropédica, RJ, EDUR, v. 25, n. 1, Jan.-Jun., p.93-96, 2005.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. *A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs*. **CSIRO** - Division of Food Processing, Australia, 2002, 116p.

LIN, M. T. ; DIANESE, J. C. A coconut – agar medium rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, p. 1466-1469, 1976.

MARTINS, H. M. ; MARTINS, M. L. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal: 1996-1999). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 37, n. 538, p. 85-88, 2001.

MELO, J. T. Avaliação dos níveis de contaminação microbiológica ambiental das diversas áreas de produção do laboratório de fitoterápicos do programa de plantas medicinais da Universidade Federal de Juiz de Fora. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. V.12, n. 2, Abr. 2000, p. 45-50.

MÍDIO, A. F. ; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. p.295.

MORAES, A. M. Agronegócio do camarão no Piauí. **Carta CEPRO**, Teresina, v. 20, n. 3, p. 7-12, 2001.

MOREIRA DA SILVA, R. M. **Especificações microbiológicas para ambientes, manipuladores e equipamentos em restaurantes industriais em Minas Gerais**. 1996. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1996.

PATSOUKIS, N ; GEORGIU, C. D. Effect of sulfite–hydrosulfite and nitrite on thiol redox state, oxidative stress and sclerotial differentiation of filamentous phytopathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. Volume 88, Issue 2, June 2007, Pages 226-235.

PEREIRA, M. M. G. **Pesquisa de fungos produtores de micotoxinas e aflatoxinas em alimento animal e aflatoxina M₁ em leite**. 2003. 172 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

PITT, J. I. Guía del laboratorio para la identificación de especies comunes de *Penicillium*. **CSIRO** - Division of Food Processing, Australia, 2004, 199p.

PITT, J.I & HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Second edition. London: Black Academic & Professional - Chapman & Hall, 1999, 593p.

QUEIROZ, et al. Avaliação de substratos vegetais destinados a alimentação animal como suportes para a produção de ochratoxina A por espécies do gênero *Aspergillus* FR. **Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Vida**. Seropédica, RJ, EDUR, v. 25, n. 1, Jan.-Jun., p. 64-70, 2005.

REIS, J. A. et al. Estudo higiênico-sanitário dos camarões dulcícolas *Macrobrachium amazonicum* e *M. jelskii*. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 116/117, p. 58-57, 2004.

ROCHA, I. P. **Impactos sócio-econômicos e ambientais da carcinicultura brasileira: mitos e verdades**. Disponível em: [http:// www.abccam.com.br](http://www.abccam.com.br)>. Acesso em 24 de abr. 2007.

ROSA, C. A. R. et al., (2006). “Mycoflora and ochratoxin-producing ability by *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from poultry feed in Brazil”. **Veterinary Microbiology** (113:89-96).

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.

SANTOS, F. C. F. **Pesquisa de fungos micotoxígenos em rações e de micotoxina em camarões cultivados no litoral do Piauí**. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2006.

SIGMA STAT for windows version 1.0. Jandel Corporation, 1994.

SIQUEIRA JÚNIOR, W. M. et al. Qualidade microbiológica do ar de ambientes de uma indústria de processamento de carnes, avaliadas pelas técnicas da sedimentação em placas e impressão em meio sólido. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n 135, p. 98-102, 2005.

SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; RUDE, R. A.; FRANK, J. F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F.; SPECK, M. L. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: APHA, 1992. cap. 3, p. 51-74.

TAVEIRA, J. A. ; MÍDIO, A. F. Aflatoxina M₁ – A micotoxina do leite.

Boletim da Sociedade Brasileira em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, v. 33, n. 1, p. 115-126, jan./jun. 1999.

TRABULSI, L. R. Et al. **Microbiologia médica**. São Paulo: Atheneu. 2002. p. 586.

VILLARREAL-CAVAZOS, et al. Efecto de las micotoxinas em la nutrición de camarones peneidos. In: MEMORIAS DEL SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 7., AVANCES EM NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 7., Hermosillo, 2004. **Anais...** Hermosillo, 2004, p.463-479.

C167i

Calvet, Rodrigo Maciel
Isolamento e identificação de fungos
toxígenos em carcinicultura marinha /
Rodrigo Maciel Calvet. - 2008.
83f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade
Federal do Piauí, 2008.

Orientação: Prof. Dr. Maria Christina Sanches
Muratori

1. Carcinicultura 2. Fungos toxígenos 3.
Litopenaeus vannamei 4. Micotoxinas I.
Título.

CDD 639.543