

FRANCISCO DAS CHAGAS CARDOSO FILHO

**MONITORAMENTO DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E AFLATOXINAS EM RAÇÕES
UTILIZADAS NA PISCICULTURA EM TERESINA, PIAUÍ, BRASIL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TERESINA-PIAUÍ
2011**

FRANCISCO DAS CHAGAS CARDOSO FILHO

**MONITORAMENTO DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E AFLATOXINAS EM RAÇÕES
UTILIZADAS NA PISCICULTURA EM TERESINA, PIAUÍ, BRASIL**

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.

Área de concentração: Sanidade Animal e Reprodução

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

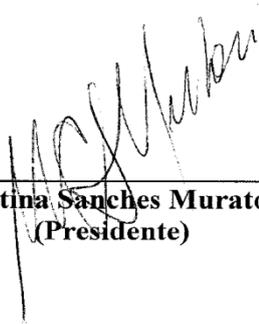
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TERESINA-PIAUI
2011**

**MONITORAMENTO DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E AFLATOXINAS EM
RAÇÕES UTILIZADAS NA PISCICULTURA EM TERESINA, PIAUÍ BRASIL**

FRANCISCO DAS CHAGAS CARDOSO FILHO

Dissertação aprovada em: 07.02.2011

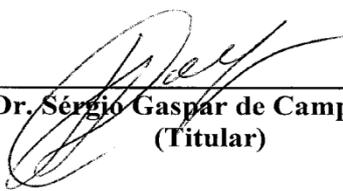
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Maria Christina Sanches Muratori / DMV/CCA/UFPI
(Presidente)



Profa. Dra. Maria Marlúcia Gomes Pereira / DMV/CCA/UFPI
(Titular)



Prof. Dr. Sérgio Gaspar de Campos / UFRRJ
(Titular)

DEDICATÓRIA

Dedico,

À Deus, que sempre me abençoou e permitiu a realização deste trabalho, abrindo oportunidades para o meu crescimento pessoal e profissional, colocando pessoas especiais e iluminadas em meu caminho;

Aos meus pais, Francisco das Chagas Cardoso e Maria Antônia Carvalho Cardoso pelo carinho, ensinamentos, educação e apoio durante toda essa minha jornada.

A meus familiares, principalmente a Letícia, Wando, Gustavo e Guilherme, companheiros de muitas alegrias, tristezas, brigas harmoniosas e vitórias alcançadas, sem esquecer o avô, das avós, tios, primos, meu padrinho Paulo Simpaúba.

Aos meus grandes amigos e companheiros Davi, Renato, Danilo, Diógenes, Diêgo, Maurício(UFPI), Maurício (fuá), Hosmylton, Juliana, Leeandro, Rodrigo, Waleska, Rosana, Aline(UFPI) Vanessa, Fernanda, Aline(fuá), Larissa, Júnior, Anderson, Rosélia e muitos outros.

À minha querida Prof^a Maria Christina Sanches Muratori pelos grandes e iluminados conselhos que sempre me incentivaram a crescer e buscar o melhor.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí pela oportunidade de crescimento profissional;

À Prof^a Maria Christina Sanches Muratori, por tudo que me ajudou a conquistar, pela paciência, dedicação, ensinamentos, oportunidades, orientação e conselhos;

À Prof^a Maria Marlúcia Gomes Pereira que contribuiu de forma significativa para a elaboração deste e de outros trabalhos, sempre quando precisei tava a disposição;

Ao Prof^o Manoel Henrique Klein Júnior, além de grande professor um amigo;

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

Aos amigos da Pós Graduação em Ciência Animal, por compartilharmos angústias, sofrimentos e bons momentos, em especial ao Hosmylton, Juliana, Maurício e Deyse;

A nossa equipe de pesquisa, Rodrigo, Waleska, Etelvina, Cecília, Ygor, Aline e Ana Luisa;

As amigas da Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, Rosana e Marta.

Aos amigos da Graduação em Medicina Veterinária, em especial a Liliane, Verbena, Cris, Julliet, Vânia e Willians;

A minhas amigas virtuais que sempre torceram por mim, Nayara, Bel, Jéssica, Dani, Deise.

A minhas amigas virtuais que se tornaram reais, Fernnanda, Sandra, Kelly Polliana, Cássia, Cyntia, Danizinha, entre outras.

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 serviu de incentivo para que e dedicasse exclusivamente no projeto;

A professora Dr^a Maria Nazaré, pelo apoio e a disponibilidade dada sempre quando precisada.

Às propriedades piscicultoras da cidade de Teresina, agradeço em nomes a Danúbia, Kelly e ao Felipe pela receptividade e disponibilidade para a aquisição de amostras;

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 integrantes da equipe de pesquisa em Micologia e Micotoxicologia da UFRRJ: Kelly, Luiz, Ana, Tati (1), Tati (2), Tayane, Michele, Fran, e Águida, pela grande ajuda, ensinamentos e amizade;

À Universidade Nacional de Río Cuarto onde tive oportunidade de aprender mais, e fazer etapas do meu trabalho;

Aos pesquisadores e amigos adquiridos em Río Cuarto: Carina, Gabriela, Pancho, Sofia, Guiller, Maria Marta, Adriana Torres, Palala, Carla, German, Daiana À Profª Ana Dalcero, pelos ensinamentos fornecidos e oportunidade de ter estagiado na UNRC, onde busquei novos conhecimentos;

Aos funcionários do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA), ao Seu Aminthas, Antônio, Lili, Zé Omar, e em especial ao companheiro George

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

LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRAT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Ração	1
1.2 Fungos	1
1.3 Micotoxinas	4
2 CAPÍTULO I	10
2.1 Resumo	11
2.2 Abstrat	12
2.3 Introdução	12
2.4 Material e métodos	14
2.5 Resultados e discussão	16
2.6 Conclusão	20
2.7 Referências	20
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Médias das contagens de fungos filamentosos e leveduras por propriedade isoladas de dois tipos de rações para peixes.	
	15
Tabela 2. Ocorrência (%) de fungos filamentosos isolados das amostras de ração para peixes.	
	16
Tabela 3. Densidade relativa (%) de espécies de <i>Aspergillus</i> isoladas das amostras de ração para peixes.	
	17
Tabela 4. Densidade relativa (%) de espécies de <i>Penicillium</i> isoladas das amostras de ração para peixes.	
	18

RESUMO

A qualidade dos produtos utilizados na alimentação de peixes de viveiro se tornou um fator limitante para a atividade, pois estes alimentos constituem substratos ideais para o desenvolvimento de fungos, que em condições favoráveis podem favorecer a síntese de micotoxinas. Objetivou-se determinar a ocorrência de fungos e aflatoxinas em rações para peixes. Foram analisadas 36 amostras de ração para peixes, sendo essas com duas composições protéicas (juvenil/engorda), e em duas formas de uso (lacrado/aberto). Foi realizada a contagem, isolamento e a identificação das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, a capacidade toxígena das cepas da seção *Flavi*, e ainda fez-se a pesquisa de aflatoxinas na ração. As médias das contagens fúngicas variaram de 2,96 a 4,00 UFC/g em \log_{10} . e não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Foram identificados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Fusarium*, onde as espécies mais isoladas foram: *Aspergillus flavus*, *Eurotium* spp. e *Penicillium implicatum*. As cepas de *Aspergillus flavus* testadas quanto a capacidade toxígena não apresentaram produção de aflatoxina, bem como não foi detectada a presença de aflatoxinas na ração pesquisada. Conclui-se que os resultados encontrados demonstram que mesmo com uma contagem fúngica significativa não foram detectadas cepas toxígenas, o que está de acordo com os resultados observados nas rações, das quais não foram extraídas aflatoxinas. Demonstrando, que as condições de armazenamento e ambientais e ainda das cepas presentes são fatores decisivos para a ausência da aflatoxina na ração.

Palavras-chave: micobiota, micotoxinas, *Aspergillus*, alimento animal, peixes

ABSTRAT

The quality of the products used in feed for farmed fish has become a limiting factor for activity, because these foods are ideal substrates for the growth of fungi, which under favorable conditions may favor the synthesis of mycotoxins. The objective was to determine the occurrence of fungi and aflatoxins in fish. We analyzed 36 samples of fish feed, and these compositions with two proteins (juvenile / fattening), and two forms of use (sealed / open). Count was conducted, isolation and identification of species of *Aspergillus* and *Penicillium*, the ability of toxigenic strains of the section *Flavia*, and still has to be investigated for aflatoxins in feed. The mean fungal counts ranged from 2.96 to 4.00 CFU / g in log₁₀. and were not observed significant difference between treatment. We identified the *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* and *Fusarium*, where the most isolated species were: *Aspergillus flavus*, *Eurotium* spp. and *Penicillium implicatum*. *Aspergillus flavus* strains tested showed no capacity toxigenic aflatoxin production, and was not detected the presence of aflatoxins in the diet studied. We conclude that the results demonstrated that even with a significant fungal counts were not detected toxigenic strains, which is consistent with the results observed in diets, which were not extracted aflatoxin. Demonstrating that the storage conditions and environmental strains present are also decisive factors in the absence of aflatoxin in feed.

Keywords: mycoflora, mycotoxins, *Aspergillus*, animal food, fish

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ração

Ração é uma porção de alimento que é dada aos animais, sendo formuladas de acordo com as necessidades nutricionais de cada indivíduo; fatores como a idade, espécie interferem na composição dessas, e é composta de diversos ingredientes. A ração representa um dos principais custos operacionais na produção animal.

Para a sua formulação são empregados diversos ingredientes, e dentre os mais usados nas formulações para peixes são o milho, soja e trigo, dentre outros ingredientes como a farinha de carne e de peixe, que são balanceados para garantir um bom desempenho na produtividade animal, os quais constituem substratos ideais para o desenvolvimento de fungos e micotoxinas. Este desenvolvimento pode ser de origem externa devido à utilização de matéria-prima contaminada, transporte inadequado, dentre outras formas, ou interna oriunda do interior da fábrica devido à presença de partículas da matéria-prima e rações que se aderem às máquinas e equipamentos em gerais (GIMENO, 2000; DANTIGNY et al., 2005).

1.2 Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos cujos núcleos são dispersos em um micélio contínuo ou septado. Sua nutrição é obtida por absorção. São saprofitos, parasitos facultativos ou biotróficos. Crescem como célula única (leveduras) ou como colônias filamentosas multicelulares (bolor). 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).

Os fungos têm sido evidenciados como microrganismos de grande importância para os alimentos. Estes têm sido responsáveis por perdas econômicas de relevância, o que representa uma série de prejuízos em todo o mundo (DANTIGNY et al., 2005, PEREIRA, et al., 2005), devido capacidade de produzir micotoxinas, que são metabólitos secundários com potencial de toxicoses ao homem e aos animais, depois

de ingeridos O impacto causado por elas abrangem desde a queda na produtividade animal, favorecendo a uma debilidade imunológica, apresentando propriedades alergênicas, teratogênicos, carcinogênicos e mutagênicos (KAWASHIMA et al., 2002; CAST, 2003; ROSSETTO et al., 2005).

Fungos produtores de micotoxinas podem ser classificados em três grupos, conforme o habitat e os substratos oferecidos para o seu desenvolvimento da seguinte forma: fungos de campo: são aqueles que geralmente contaminam o alimento antes mesmo das colheitas; fungos de armazenamento: são aqueles que se desenvolvem durante o armazenamento do alimento e são os principais responsáveis pela deterioração dos cereais, matérias primas e das rações, e fungos de decomposição: que são os que tornam os alimentos impróprios para o consumo (MÍDIO; MARTINS, 2000; GIMENO, 2000).

Existem mais de 80 espécies fúngicas micotoxígenas, que podem produzir mais de 300 diferentes tipos de micotoxinas, sendo que algumas espécies são capazes de produzir mais de um tipo que podem ser encontradas simultaneamente em um único produto. Os principais fungos produtores pertencem aos gêneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* e *Stachybotrys*, dentre eles destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que são considerados os de maior importância para alimentos e ração, por serem os mais encontrados e os maiores produtores de micotoxinas (GIMENO, 2000; HUSSEIN; BRASEL, 2001; SASSAHARA et al., 2003; YANAKA et al., 2004; PEREIRA et al., 2005 ROSA et al., 2006; SANTOS, 2006; SIMAS et al., 2007; KELLER et al., 2007; CALVET, 2008; NUNES, 2009). Estes fungos podem ser encontrados em: arroz, milho, feijão, trigo, cevada, soja, castanha, farelo de peixe, frutas, presunto, queijo, leite e vinho (BATISTA; FREITAS, 2000; PEREIRA et al, 2005; HERMANNNS et al, 2006; CHIOTTA, et al, 2009).

1.2.1 *Aspergillus* spp.

Os fungos deste gênero habitam em uma ampla variedade de ambientes, sendo os mais freqüentes em solo e alimentos. Algumas espécies, principalmente o *Aspergillus oryzae* têm importância econômica na manufatura da fermentação de alimentos, como na produção de sake, assim como a utilização de suas enzimas na

alimentação de bovinos. Os *Aspergillus* também podem causar impacto negativo na economia tanto pela produção de toxinas potentes, quanto pela deterioração de alimentos (KLICH; PITT, 1988; PITT; HOCKING, 1999; SAMSOM, 2001; RIIBEIRO et al., 2003; EMBRAPA, s.d.).

1.2.2 *Penicillium* spp.

O gênero *Penicillium* possui a maior quantidade de espécies e pode ser encontrado em quase todos os substratos. São considerados ubíquos e saprófitos oportunistas. A maioria das espécies habita o solo, e sua ocorrência em alimentos dá-se de forma acidental. Algumas espécies causam patologias graves e destrutivas em frutos e cereais, crescendo com baixa presença de oxigênio, atividade de água mínima de 0.80. Vários são psicotróficos e capazes de causar deterioração alimentar em produtos mantidos sobre refrigeração (PITT; HOCKING, 1999, SAMSOM et al, 2001).

Alguns fungos desse gênero são capazes de produzir diversas micotoxinas, como a Ocratoxina produzida pelo *Penicillium verrucosum*, a citrinina produzida pelo *P. citrinum*.

1.2.3 *Fusarium* spp.

Os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* desenvolvem-se em colônias que apresentam crescimento rápido e são largamente distribuídas no solo, principalmente nos cultivados, estando presente na decomposição da celulose de algumas plantas. Eles são a maior causa de deterioração em frutos e vegetais e são comumente encontrados em cereais de forma geral (PITT; HOCKING, 1999, SAMSOM, 2001). Muitas das espécies de *Fusarium* são patógenas e destroem os cereais e outros produtos. A produção de micotoxinas ocorre antes ou logo após a colheita, sendo as mais estudadas as fumonisinas e zearalenona.

1.3 Micotoxinas

A pesquisa das micotoxinas assume um papel importante na área de alimentos, tendo em vista o risco potencial que pode ocasionar aos consumidores, bem como as perdas econômicas provocadas, que representam um percentual bastante elevado no cenário mundial (PEREIRA et al., 2005). A micobiota e o nível de contaminação das micotoxinas em rações animais vêm sendo monitoradas em diversas partes do mundo (MAGNOLI et al., 1998; SIAME et al., 1998; ROSA et al., 2006).

As micotoxinas apresentam, de modo geral, grande estabilidade química que permite sua permanência no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos normais de industrialização como: congelamento, pasteurização, cozimento, secagem, salga, ou seja, mesmo que o alimento sofra o processamento a micotoxina ainda poderá estar presente (TRISTAN, 2002).

As micotoxicoses apresentam alterações que dificilmente são detectadas em inspeção animal, a não ser quando expostos a muito tempo, com a presença de tumores, hoje sabe-se que diversos alimentos contaminados com concentrações baixas de micotoxinas são amplamente utilizados na alimentação humana (DILKIN; MALLMANN, 2004). As micotoxicoses apresentam-se de três formas: aguda, subaguda ou na forma crônica (FIGUEIRA et al., 2003). As micotoxicoses agudas são aquelas em que o efeito aparece em poucas horas após a ingestão da micotoxinas, normalmente quando essa ingestão é de grandes concentrações, já a de forma subaguda, são aquelas que a quantidade de micotoxina ingerida são menores que na forma aguda, mas os sinais de intoxicações aparecem em alguns dias, já a de forma crônica é aquela em que a ingestão de micotoxinas ocorre em pequenas doses e de forma contínua, sendo que os sinais vão aparecer a longo prazo, como exemplos temos os tumores.

Alguns fatores podem influenciar na toxicidade das micotoxinas como: a espécie e raça dos animais; nível e duração da contaminação; nutrição e saúde dos animais; idade e sexo; infecções bacterianas, virais ou parasitárias; condições inadequadas de habitat dos animais (temperatura, umidade e ventilação); presença de várias micotoxinas e sinergismos entre elas; tipos e variedades de matérias-primas (GIMENO, 2000).

Rações contaminadas por micotoxinas, além de reduzir o desempenho e afetar o estado geral de saúde do animal (principalmente em aves, suínos, bovinos e cavalos), causam redução da produtividade, declínio na produção de ovos, problemas reprodutivos, vulnerabilidade a infecções, aumento da morbidade e por último a mortalidade, constituem um risco para os seres humanos, uma vez que produtos animais contendo resíduos de micotoxinas, como o leite, ovos e na carne, vêm se transformando em um grave problema de saúde pública, pois ao serem consumidos por pessoas podem causar possíveis danos à saúde como: ocorrência de doenças auto-imunes, apresentando propriedades alergênicas, teratogênicos, carcinogênicos e mutagênicos (BATH; VASANTHI, 1999; KAWASHIMA et al., 2002; CAST, 2003; GONÇALEZ et al., 2004; ROSSETTO et al., 2005).

A maioria de mortes em animais de produção tem sido causada pelas micotoxinas, principalmente as aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona e ocratoxina. São registradas perdas na produção devidas a uma combinação dessas micotoxinas e sua presença nas rações. (BATH; VASANTHI, 1999)

1.3.1 Aflatoxinas

Essas micotoxinas são principalmente produzidas por fungos da espécie *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, que são ubíquos no ambiente e potencialmente capazes de produzir contaminação direta em uma grande variedade de alimentos, como: cereais, tortas de oleaginosas, mandioca e toda uma série de alimentos para o homem como arroz, frutas, frutos desidratados, produtos de salsicharia, vinhos, leguminosas, e o leite e derivados (GIMENO, 2000; MÍDIO; MARTINS, 2000; SAMSOM et al, 2001; PEREIRA et al, 2005; HERMANNNS et al, 2006; REDDY et al., 2009; ROIGÉ et al., 2009; FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010).

Existem, até o momento, 18 tipos de aflatoxinas (MÍDIO; MARTINS, 2000; GIMENO, 2000), sendo que a aflatoxina B1 é a mais prevalente e biologicamente ativa dentre as aflatoxinas, e é considerado o mais potente hepatotóxico e carcinogênico, além de ser um imunossupressor natural conhecido por afetar humanos e animais (CREPPY, 2002; WILLIAMS et al., 2004). E seus efeitos variam com a espécie, idade, sexo e estado nutricional (CAST, 2003), ela possui características nefrotóxicas,

mutagênicas, teratogênicas e também causam encefalopatias. Tem sido identificada como fator associado ao câncer hepático, após a ingestão de alimentos contaminados, tanto em animais como no homem (GIMENO, 2000; FERREIRA et al., 2006).

A ocorrência de aflatoxinas em produtos destinados à alimentação animal é oriunda de vários estados do Brasil; Paraná (SASSAHARA et al., 2003; HASHIMOTO et al., 2003), Minas Gerais (PEREIRA et al., 2005), São Paulo (OLIVEIRA et al., 2006), Rio de Janeiro (ROSA et al., 2006; KELLER et al., 2007). Os sinais da intoxicação por aflatoxinas dependem principalmente de sua concentração no alimento, do tipo de toxina de aflatoxina e do tempo de ingestão (OGIDO et al., 2004). A ingestão em alimentos muito contaminados produz, em geral, efeitos agudos, caracteristicamente hepatotóxico (necrose e degeneração gordurosa) recebendo a denominação de aflatoxicose (MÍDIO; MARTINS, 2000), também caracterizada pela imunodepressão e por anomalias ósseas, hemorragias e despigmentação (MIAZZO et al., 2005).

Os efeitos biológicos da aflatoxina B1 em peixes são diretamente ligados a espécie, nível na alimentação e na idade do animal (EATON; GROOPMAN, 1994). Animais jovens são mais suscetíveis a aflatoxicose do que os adultos e algumas espécies de peixes como trutas são mais sensíveis do que tilápias para Aflatoxinas (HENDRICKS, 1994; WILLIAMS et al., 2009).

Os principais sinais de aflatoxicose em peixes são a redução do peso corporal, alterações hematológicas, necrose dos hepatócitos (JANTRAROTAI et al., 1990; SÁNCHEZ et al., 1994; MANNING et al., 2005; EL-SAYED; KHALIL, 2009). Além disso, a transmissão de aflatoxinas com resíduos tóxicos em peixes pode representar uma ameaça aos seres humanos por serem carcinogênicos, teratogênicos imunossupressores e causadores de outros efeitos adversos (BINTVIHOK et al., 2003; MANNING et al., 2005).

A no Brasil uma recomendação do Ministério da Saúde, de que para qualquer ingrediente a ser utilizado na formulação de rações, não deve exceder os níveis de 50 µg/kg de aflatoxinas, esse limite também vale para o produto final, ou seja a ração (BRASIL, 2002).

Os níveis de aflatoxinas em rações para peixes pesquisadas em Londrina, PR variaram desde não detectável a 15,60 ng/g (HASHIMOTO et al., 2003).

1.3.2 Ocratoxinas

As ocratoxinas são uma das principais micotoxinas encontradas em rações, naturalmente produzidas por fungos das espécies *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* e *Penicillium verrucosum*. Existem sete tipos de ocratoxinas, sendo a mais tóxica a ocratoxina A. (MAGNOLI et al, 2004, 2006; WELKE et al., 2009).

As ocratoxinas têm sido encontradas em diferentes tipos de alimentos incluindo o trigo, milho, café, cacau, cevada, cerveja, figos secos, centeio, queijo, pão, uva e produtos derivados, feijão seco, grãos de soja, frutas cítricas, castanhas do Brasil, tabaco mofado, presunto curado, amendoins e demais produtos similares. Os principais metabólitos secundários são as ocratoxinas A, B e C (JAY, 2005; WELKE et al., 2009).

A Ocratoxina A (OTA) possui diversas propriedades tóxicas, principalmente nefrotóxicas (JECFA, 2001). Esta micotoxina foi associada à nefropatia endêmica dos Balcãs, doença caracterizada por progressiva redução das funções renais em humanos. Em estudos com animais, a OTA tem demonstrado efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, imunossupressores, genotóxicos e neurotóxicos (CAST, 2003).

1.3.3 Zearalenona

A zearalenona é produzida por diversas espécies de *Fusarium*, principalmente pelas espécies, *F. graminearum*, *F. equiseti* e *F. semitectum*, são fungos considerados invasores secundários mais frequentemente associados ao solo (DESARDINS, 2006; LESLIE; SUMMERELL, 2006). Dentre os alimentos que apresentam maior probabilidade de contaminação, destacam-se: milho, trigo, cevada, aveia, sorgo, banana, mandioca, sorgo, feijão, soja e nozes (CAZANAVE; MÍDIO, 1998; SCHWARZER, 2009)

É um composto não-esteróide que exibe atividade estrogênica em animais de produção como: bovinos, ovinos e suínos, os principais sinais nas fêmeas são: tumefação vulvar, prolapso vaginal, atrofia dos ovários, hipertrofia das mamas e úteros,

já nos machos causam atrofia dos testículos e hipertrofia das mamas (GIMENO, 2000; MÍDIO e MARTINS, 2000; SCWARZER, 2009).

1.3.4 Fumonisinias

Fumonisinias (FBS) são um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*, que são os fungos mais frequentemente associados à contaminação em grãos de milho, sendo o primeiro o mais prevalente (RHEEDER et al., 2002; GONZÁLEZ PEREYRA et al., 2008; MORENO et al., 2009), onde esta contaminação, tanto pelos fungos como pelas micotoxinas, tem sido relatada previamente em grãos de milho no mundo todo (LOGRIECO et al., 2002; RHEEDER et al., 2002).

Existem pelo menos sete diferentes compostos de ocorrência natural que fazem parte do grupo das fumonisinias: Fumonisinias B1, B2, B3, B4, A1, A2 e A3, sendo as três primeiras as mais freqüentemente isoladas em milho e seus derivados (PITT; HOCKING, 1999; JAY, 2005) e aparetemente são as únicas que são produzidas em quantidades significantes em condições naturais (AZIZ et al., 2005).

Fumonisina B1 é classificado como um carcinogênico humano (IARC, 2003), o consumo de alimentos contaminados por fumonisinias tem sido relacionado à incidência de câncer hepático e de esôfago (RHEEDER et al., 1992; MARASAS et al., 2004) e também na formação do tubo neural (MISSMER et al., 2006). Além disso, as fumonisinias podem causar uma variedade de problemas de saúde dos animais, com isso reduzindo a sua produtividade. Os níveis de fumonisinias nos alimentos são dependentes do grau de contaminação e dos processos de transformação utilizados na produção do produto final. (KATTA, 1997). As fumonisinias são estáveis ao calor e sobrevivem sob condições de cozimento ou fritura, que é em torno de 70° C e 120°C, respectivamente dependendo do tipo de alimento (HUMPF, 2004).

A partir do que foi citado, foi observado que fungos e suas micotoxinas podem trazer diversos problemas tanto para a saúde animal como para a humana, e como ainda são escassos os trabalhos com a pesquisa de fungos em ração principalmente na nossa região, e esses se desenvolvem principalmente em condições inadequadas

de armazenamento, se da a importância desse trabalho verificando as condições em que essa ração esta armazenada, se em uso ou não.

Baseado nestes dados a seguinte hipótese foi formulada: as condições de armazenamento e a sua manipulação inadequada podem influenciar na presença e no desenvolvimento de fungos toxigênicos e suas micotoxinas nas rações utilizadas em piscicultura.

Para testar a hipótese, os objetivos do presente trabalho foram:

Avaliar a presença de fungos micotoxigênicos na ração estocada e em uso;

Quantificar a presença de fungos e pesquisar aflatoxinas nos diferentes tipos de rações durante o período de crescimento do peixe;

Então para testar essa hipótese, esse trabalho tem um capítulo intitulado de **Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas na piscicultura**. Este trabalho foi escrito conforme a formatação da Revista Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

CAPÍTULO I

Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas na piscicultura

Monitoring of toxigenic fungi and aflatoxins in feeds used in fish farming

Francisco das Chagas Cardoso Filho^{1*}; Maria Christina Sanches Muratori²; Rodrigo Maciel Calvet¹; Maria Marlúcia Gomes Pereira²; Amilton Paulo Raposo Costa²; Carlos Alberto da Rocha Rosa³

¹ Médico Veterinário, Doutorando em Ciência Animal – Campus da Socopo, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, Ininga, CEP: 64039-550, Teresina, PI, Brasil; E-mail: veterinario_filho@hotmail.com. *Autor para correspondência

² Docentes do Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Campus da Socopo, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, Ininga, CEP: 64039-550, Teresina, PI, Brasil; E-mail: chrismuratori@uol.com.br; marlucia-gomes@hotmail.com; amilfox@uol.com.br

³ Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas (NPMM), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rodovia BR 465, Km 07, PSA – EMBRAPA/UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil, CEP: 23890-000, E-mail: shalako@ufrj.br

Resumo

A qualidade dos produtos utilizados na alimentação de peixes de viveiro se tornou um fator limitante para a atividade, pois estes alimentos constituem substratos ideais para o desenvolvimento de fungos, que em condições favoráveis podem favorecer a síntese de micotoxinas. Objetivou-se determinar a ocorrência de fungos e aflatoxinas em rações para peixes. Foram analisadas 36 amostras de ração para peixes, sendo essas com duas composições protéicas (juvenil/engorda), e em duas formas de uso (lacrado/aberto). Foi realizada a contagem, isolamento e a identificação das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, a capacidade toxígena das cepas da seção *Flavi*, e ainda fez-se a pesquisa de aflatoxinas na ração. As médias das contagens fúngicas variaram de 2,96 a 4,00 UFC/g em log₁₀. e não foram observados diferença significativas entre os tratamento. Foram identificados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Fusarium*, onde as espécies mais isoladas foram: *Aspergillus flavus*, *Eurotium* spp. e *Penicillium implicatum*. As cepas de *Aspergillus flavus* testadas quanto a capacidade toxígena não apresentaram produção de aflatoxina, bem como não foi detectada a presença de aflatoxinas na ração pesquisada. Conclui-se que os resultados encontrados demonstram que

mesmo com uma contagem fúngica significativa não foram detectadas cepas toxígenas, o que está de acordo com os resultados observados nas rações, das quais não foram extraídas aflatoxina. Demonstrando, que as condições de armazenamento e ambientais e ainda das cepas presentes são fatores decisivos para a ausência da aflatoxina na ração.

Palavras-chave: microbiota, micotoxinas, *Aspergillus*, alimento animal, peixes

Abstrat

The quality of the products used in feed for farmed fish has become a limiting factor for activity, because these foods are ideal substrates for the growth of fungi, which under favorable conditions may favor the synthesis of mycotoxins. The objective was to determine the occurrence of fungi and aflatoxins in fish. We analyzed 36 samples of fish feed, and these compositions with two proteins (juvenile / fattening), and two forms of use (sealed / open). Count was conducted, isolation and identification of species of *Aspergillus* and *Penicillium*, the ability of toxigenic strains of the section *Flavia*, and still has to be investigated for aflatoxins in feed. The mean fungal counts ranged from 2.96 to 4.00 CFU / g in log₁₀. and were not observed significant difference between treatment. We identified the *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* and *Fusarium*, where the most isolated species were: *Aspergillus flavus*, *Eurotium* spp. and *Penicillium implicatum*. *Aspergillus flavus* strains tested showed no capacity toxigenic aflatoxin production, and was not detected the presence of aflatoxins in the diet studied. We conclude that the results demonstrated that even with a significant fungal counts were not detected toxigenic strains, which is consistent with the results observed in diets, which were not extracted aflatoxin. Demonstrating that the storage conditions and environmental strains present are also decisive factors in the absence of aflatoxin in feed.

Keywords: mycoflora, mycotoxins, *Aspergillus*, animal food, fish

Introdução

A piscicultura no Estado do Piauí esta em fase de desenvolvimento e o crescente aumento do consumo tem correspondido positivamente para este crescimento. Neste contexto, a qualidade dos alimentos destinados ao consumo de peixe pode ser um fator limitante na cadeia produtiva e a utilização de alimentos com qualidade torna-se essencial para a produção (Naylor et al., 2000). Os piscicultores dispõem de rações comerciais formuladas especialmente para atender às necessidades nutricionais dos peixes nas diversas fases de crescimento. Essa ração representa um

dos principais custos operacionais na produção, onde para sua formulação são empregados diversos ingredientes, dos quais fornecem nutrientes essenciais para o desenvolvimento dos animais, bem como tontêm os substratos ideais para o crescimento dos fungos e seus metabólitos, desde que haja condições extrínsecas e intrínsecas favoráveis (Gimeno, 2000; Dantigny et al., 2005). Os fungos têm sido evidenciados como microorganismos de grande importância para a indústria de alimentos, essa contaminação por fungos pode causar inúmeras perdas econômicas associadas à redução de nutrientes, da palatabilidade e à presença de micotoxinas, afetando tanto a saúde humana como a animal (Scussel, 2002, Dantigny et al., 2005, Pereira et al., 2005, Fonseca, 2006).

As principais causas das contaminações por fungos estão relacionadas à utilização de ingredientes contaminados, algumas espécies podem resistir ao processamento e conseguir se desenvolver quando as rações são armazenadas em condições inadequadas, expostas a elevada umidade relativa (FAO, 2004). Vale ressaltar que parte das contaminações pode ocorrer no momento do uso das rações nas propriedades, as quais após a abertura das embalagens ficam expostas ao ambiente e suas condições adversas (Martins e Martins, 2001).

Os fungos podem produzir micotoxinas, que são metabólitos secundários com potencial para produzir toxicoses no homem e nos animais. O impacto causado por elas inclui queda na produtividade animal, doenças auto-imunes, desencadeamento de alergias, alterações teratogênicas, carcinogênicas, mutagênicas, dentre outras, tanto para o homem como para os animais (Cast, 2003; Rossetto et al., 2005).

A presença de fungos na ração não significa necessariamente a presença de micotoxinas (Pereira et al., 2002), entretanto, elevadas contagens fúngicas são consideradas indicativo da presença de micotoxinas no alimento (FAO, 2004). Por isso, a micobiota e o nível de contaminação das rações animais com micotoxinas vêm sendo monitoradas em diversas partes do mundo e os gêneros fúngicos mais encontrados em rações comerciais são: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Martins e Martins, 2001; Guerra et al., 2005; Pereira et al., 2005; Magnoli et al., 2006; Rosa et al., 2006; Simas et al., 2007; Keller et al., 2007; Binder et al., 2007; Kan e Meijer, 2007).

Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas (AFs) são as mais estudadas, são essencialmente produzidas por fungos das espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, Estes são ubíquos no ambiente e potencialmente capazes de produzir contaminação direta em uma grande variedade

de alimentos. Existem, até o momento, 18 tipos de aflatoxinas (Mídio e Martins, 2000; Gimeno, 2000) e a ocorrência de contaminação por AFs é global, causando problemas graves, especialmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, a ocorrência de aflatoxinas em produtos destinados à alimentação animal tem sido registrada em várias regiões (Sassahara et al., 2003; Yanaka et al., 2004; Pereira et al., 2005; Rosa et al., 2006; Simas et al., 2007; Keller et al., 2007).

As AFs são altamente cancerígenas e podem causar toxicidade aguda quando em concentrações elevadas (Kabak e Dobson, 2006; Khanafari et al., 2007). Além disso produzem efeitos mutagênicos, teratogênicos e imunossupressores (Murthy et al., 2005). Por isso são motivo de grande preocupação devido aos seus efeitos nocivos sobre a saúde dos seres humanos e animais.

Diante do exposto e da importância da qualidade dos alimentos fornecidos a cadeia produtiva de peixes e o que isso pode representar para a produção e o consumidor torna-se necessário o controle da qualidade dos alimentos fornecidos aos animais através da pesquisa de fungos e aflatoxinas.

Material e Métodos

A pesquisa foi realizada na cidade de Teresina, Piauí. Realizou-se um levantamento do número de propriedades piscicultoras da região e constatou-se a existência de 16 no total, destas foram sorteadas três fazendas para coleta das amostras e constatou-se que cada fazenda utilizava dois tipos de rações, uma para a fase juvenil e outra para a fase de crescimento, cada amostra tinha em torno de 500 g, onde essa foi retirada de diferentes partes do saco de ração. Foram coletadas um total de 36 amostras, 12 amostras por propriedade, o correspondente, a seis coletadas por fase (duas) e de cada fase três coletas para embalagem lacrada e três para embalagem em uso. As análises foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos, do Núcleo de Estudos e Pesquisas de Processamento em Alimentos (NUEPPA), da Universidade Federal do Piauí - UFPI e no laboratório de Micologia da Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

O procedimento para cada amostra foi iniciado com a trituração em liquidificador e em seguida foi retirada uma alíquota de 25g, que foi diluída em 225 mL de água peptonada a 0,1%, formando diluição inicial (10^{-1}), a partir desta foram preparadas diluições decimais seriadas até 10^{-3} . A inoculação foi feita em duplicata, foram alíquotas de 0,1mL por placa de Petri, na

superfície do meio de cultivo Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol (DRBC), de cada uma das diluições (Pitt e Hocking, 1999). As placas de DRBC foram incubadas a 25° por sete dias, em ausência de luz. As contagens fúngicas foram realizadas nas placas que apresentaram entre 10 a 100 UFC/g (Dalcero et al., 1997; Dalcero et al., 1998). Após contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/g), as colônias fúngicas selecionadas para identificação (*Aspergillus* e *Penicillium*) foram isoladas e repicadas em tubos contendo agar extrato de malte (MEA). A identificação das espécies foi realizada de acordo com a chave taxonômica de Klich (2002); Pitt (1988), respectivamente.

As cepas de *Aspergillus flavus* isoladas foram testadas quanto a produção de Aflatoxinas, elas foram cultivadas em placas MEA a 25 °C por 7 dias. O micélio foi transferido para um tubo *Eppendorf* juntamente com 1000 µL de clorofórmio. A mistura foi agitada a 4000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente, o micélio foi removido e o extrato de clorofórmio evaporado sob fluxo de N₂. O resíduo foi redissolvido em 200 µL de clorofórmio. Os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel 60 F254, TLC chapas de alumínio (20 x 20 cm, espessura, 250 µm, Merck, Alemanha). O líquido carreador foi o clorofórmio: acetona (90:10 v/v). O limite de detecção do método utilizado é de 5 µg/g.

Para extração de aflatoxina na ração, utilizou-se 25 g de cada amostra, que foi acrescida em 100 mL de acetonitrila: água (84:16, v / v), e mantida em homogeneização em shaker por 30 minutos. Após a homogeneização a mistura foi filtrada em papel Whatman N ° 4 (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, E.U.A.). Retirou-se do filtrado uma alíquota de 5,0 mL que foi transferida para um tubo de 10 mL. Purificou-se o filtrado com o uso de colunas Multifuncional Mycosep 224 (MFC, Romer Labs ®, Inc., MO., E.U.A.). Após essa limpeza, foram coletados 2,0 mL do extrato purificado, que foram evaporados sob fluxo de N₂. No momento da utilização, os extratos foram re-dissolvidos utilizando 200 µL da fase móvel. A detecção de aflatoxina B1 e quantificação de cada amostra foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com Truckess et al., (1994) Uma alíquota (200 µL) foi derivatizada com 700 µL de ácido acético-água-ácido trifluoroacético (20:10:70, v / v). Separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de fase reversa (Silica Gel, 150 x 4,6 mm id, tamanho de partículas de 5 µm, Varian, Inc. Palo Alto, E.U.A.). A fase móvel empregada foi o acetonitrila:metanol:água (1:1:4 v / v / v), o volume injetado foi de 20 µL e a velocidade do fluxo foi de 1,5 mL por min. A detecção das aflatoxinas foi por fluorescência utilizando um comprimento de onda de 360

nm de excitação e 440 nm de emissão. As curvas padrão foram construídas com diferentes níveis de AFB₁. O limite de detecção do método foi de 0,4 ng/mL.

Os resultados das contagens foram transformados em log₁₀, correlacionados e realizada a análise de variância com significância (p<0,05), havendo diferença será aplicado o teste SNK para a comparação de médias, utilizando o programa estatístico Sigma Stat (1994).

Resultados e Discussão

Na tab. 1 se encontram os resultados das contagens de fungos filamentosos e leveduras isolados de dois tipos de rações para peixes, segundo as formas de armazenamento.

Tabela 1. Médias das contagens de fungos filamentosos e leveduras por propriedade isoladas de dois tipos de rações para peixes

Tipos/ condições	Médias P 1	Médias P 2	Médias P 3	Médias das Contagens fúngicas	Variação	(%) > acima do limite indicado(*)
J/L (n=9)	3,08	4,74	2,00	3,27	1,70-4,83	44,4 (n=4)
J/A (n=9)	3,80	4,88	3,33	4,00	2,20-5,00	66,6 (n=6)
C/L (n=9)	3,48	2,53	2,88	2,96	1,70-3,87	0 (n=0)
C/A (n=9)	3,21	3,21	2,96	3,07	1,70-4,59	22,2 (n=2)

UFC/g= unidade formadora de colônias por grama em log₁₀. Nível máximo recomendável: 4,00 log₁₀ UFC/g (GMP, 2008), (*): (P = 0.30). J/L=juvenil/lacrado; J/A=juvenil/aberto; C/L=crescimento/lacrado; C/A= crescimento/aberto. N= amostras;P= propriedades

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos tratamentos pesquisados, ou seja, as médias de contagem de fungos foram estatisticamente semelhantes nas rações do tipo juvenil e crescimento assim como não houve diferença entre as rações armazenadas lacradas e as abertas, nem entre as propriedades.

No Brasil não há padrões legais para contagem de fungos em ração animal, mas segundo o padrão utilizado em outros países do mundo para certificação de ração animal (GMP, 2008), não se deve ter contagens superiores que 4,00 UFC/g em log₁₀. Com base nesse padrão, quando considerado o valor de cada amostra, observou-se que 12 (33%) das 36 amostras, apresentaram valores que excedem esses limites, considerados como padrão que visa garantir a qualidade higiênica do produto.

Estes resultados sugerem uma alta atividade de fungos, onde estes podem afetar a palatabilidade da ração e reduzir a absorção de nutrientes dos animais determinando um

substrato de baixa qualidade, além da possibilidade desses produzirem micotoxinas, indicando que possivelmente essas rações não estariam armazenadas de maneira adequada (FAO, 2004). A micobiota total (Tab. 1) foi semelhante aos valores relatados por outros autores em cereais e em rações (Dalcero et al., 1997; Magnoli et al, 2002; Accensi et al., 2004; Rosa et al., 2006; Keller et al., 2007) e superior aos estudos realizados por Oliveira et al.(2007); Ribeiro et al.(2009). Esse nível de contaminação pode variar em função das condições climáticas da região, do período de coleta, das condições de processamento do alimento e da forma em que está armazenado (Ribeiro et al., 2009).

O fato de não haver diferença estatisticamente significativa entre as amostras lacradas e abertas, revela uma boa condição de conservação ou condição de ambiente desfavorável ao crescimento de fungos visto que outros autores observaram que a contaminação e as contagens fúngicas tendem a ficar exacerbadas após a abertura das embalagens, pela maior exposição ao ambiente (Bernardini e Nascimento, 2005).

Na tab. 2, observa-se a ocorrência de fungos filamentosos isolados da ração para peixes, pode-se constatar que o gênero de maior ocorrência foi o *Aspergillus* e Teleomorfos com mais de 50% das cepas isoladas, seguidos de *Penicillium*, *Cladosporium* e *Fusarium*. Alguns autores relataram resultados semelhantes (Magnoli et al., 2002; Keller et al., 2007).

Tabela 2. Ocorrência (%) de fungos filamentosos isolados das amostras de ração para peixes.

Gênero Fúngico	Nº de Isolados	Ocorrência (%)
<i>Aspergillus</i> e teleomorfos	41	56,16
<i>Penicillium</i>	14	19,18
<i>Cladosporium</i>	12	16,44
<i>Fusarium</i>	06	8,22
Total	73,0	100

De acordo com Ribeiro et al. (2003), o gênero *Aspergillus* é considerado como o principal deteriorador de sementes e grãos, causando danos, descoloração e alterações nutricionais. Russomanno et al. (2002), ao estudarem a presença de fungos em 190 amostras de rações industrializadas, destinadas à alimentação de cães e gatos, observaram a ocorrência de várias espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*, diferentemente dos nossos resultados que mostram poucas cepas de *Fusarium* isoladas, porém com presença de outros gêneros.

Tabela 3. Densidade relativa (%) de espécies de *Aspergillus* isoladas das amostras de ração para peixes.

Espécies	Total de cepas	Frequência (%)
<i>A. flavus</i>	26	60,47
<i>Eurotium spp.</i>	08	18,61
<i>A. oryzae</i>	03	6,98
<i>A.fumigatus</i>	03	6,98
<i>A. terreus</i>	01	2,32
<i>A. candidus</i>	01	2,32
<i>A. penicillioides</i>	01	2.32
Total	43	100

Dentre as espécies de *Aspergillus*, podemos observar na tab. 3 que a espécie que predominou com mais de 60% das cepas foi o *A.flavus*, concordando com estudos de outros autores (Dalcerro et al.,1998; Magnoli et al.,1998; Accensi et al., 2004), as demais espécies encontradas foram o seu teleomorfo *Eurotium*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. candidus* e *A.penicillioides*. Russomanno et al. (2002) também encontraram a maioria das cepas isoladas de *A. flavus*, em rações destinadas a cães e gatos. A presença de *A. flavus* nas rações representa um perigo potencial, pois pode ocasionar enfermidades nos trabalhadores que diretamente estão em contato com ela, como a aspergilose (Akan et al., 2002), alergias e problemas respiratórios pelo contato e inalação de conídios, como também causar problemas na produção animal, por ser um potencial produtor de micotoxinas. Todas as cepas de *A. flavus* foram analisadas, quanto à capacidade de produzirem aflatoxina, porém nenhuma das cepas demonstrou capacidade toxígena. A importância dessa verificação é que caso fossem produtoras seria um grande risco na alimentação dos peixes, pois a Aflatoxina B1 nas rações pode acarretar, quando ingerida, quadros de carcinoma hepatocelular, redução do peso corporal, alterações hematológicas, necrose dos hepatócitos (Manning et al., 2005; Willians et al., 2009).

Na tab. 4, podemos observar a densidade relativa das espécies de *Penicillium*, apenas quatro espécies desse gênero foram isoladas nesse estudo, diferentemente da variedade de espécies encontradas por outros autores também trabalhando com ração animal (Magnoli et al., 2006; Rosa et al., 2006). As espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* são considerados fungos de armazenamento (Gimeno, 2000).

Tabela 4. Densidade relativa (%) de espécies de *Penicillium* isoladas das amostras de ração para peixes

Espécies	Total	Frequência (%)
<i>P. implicatum</i>	08	57,15
<i>P. restrictum</i>	03	21,43
<i>P. citrinum</i>	02	14,28
<i>P. rugulosum</i>	01	7,14
Total	14	100

Muitas das espécies isoladas nesse estudo estão associadas com a perda da qualidade da ração e podem ser potenciais produtoras de micotoxinas. O isolamento dessas espécies a partir de rações animais tem sido realizado por outros pesquisadores (Magnoli et al., 2006; Rosa et al., 2006; Keller et al., 2007).

Foi verificada alta incidência de fungos nas rações para peixes, coletadas e avaliadas em Teresina, com quantidade significativa de cepas de *Aspergillus flavus* (Tab. 3) e a alta contagem fúngica é considerado indicador da provável presença de micotoxinas (Farias et al., 2000). No entanto, não foi detectada em nosso estudo a presença de aflatoxina. Isso pode ser atribuído ao curto espaço de tempo para a formação das toxinas ou mesmo ao número reduzido de linhagens fúngicas com potencial toxigênico, de acordo com Pereira et al. (2002), como se foi observado, as cepas de *Aspergillus flavus* isoladas não produziam aflatoxinas. Em trabalho realizado por Guerra et al. (2005) com alimentos para eqüinos, também não foi detectada a presença de aflatoxinas nas 50 amostras.

Os níveis de aflatoxinas em rações para peixes utilizadas em Londrina, Paraná variaram desde não detectável a 15,60 ng/g (Hashimoto et al., 2003). Já Nunes (2009) pesquisando aflatoxinas em rações para peixes oriundas da indústria da cidade de Teresina, Piauí, constatou também a presença dessas micotoxinas em várias amostras de ração, como também na matéria prima utilizada para a sua formulação.

Existe uma recomendação do Ministério da Saúde, de que para qualquer matéria prima utilizada diretamente ou como ingrediente nas rações, ou para a própria ração, não deve apresentar valores de aflatoxinas superiores a 50 µg/kg (BRASIL, 2002), portanto todas as

amostras utilizadas nesse estudo estão de acordo com o padrão no que corresponde a presença de aflatoxinas, pois em nenhuma das 36 amostras foi detectada.

Portanto, a importância da determinação da micobiota fúngica e de suas micotoxinas nos alimentos utilizados na alimentação animal, são de que esses estudos podem fornecer informações inerentes qualidade do produto, no tocante a presença de fungos e suas micotoxinas, no que devem ser observados o uso de ação preventiva nas fases de produção, colheita e armazenamento, etapas iniciais para o controle dos fungos e seus metabólitos, sobre quais micotoxinas podem ser potencialmente encontradas nas amostras, práticas adicionais são necessárias para reduzir a contaminação dos alimentos e procedimentos para o tratamento de muitos alimentos e que são de suma importância para evitar perdas na produção animal e riscos para saúde de animais e humanos.

Conclusões

Conclui-se que os resultados encontrados demonstram que mesmo com uma contagem fúngica significativa não foram detectadas cepas toxígenas, o que está de acordo com os resultados observados nas rações, das quais não foram extraídas aflatoxinas. Demonstrando, que as condições de armazenamento e ambientais e ainda das cepas presentes são fatores decisivos para a ausência da aflatoxinas na ração.

Referências

- ACCENSI,F., ABARCA,M.L.and CABAÑES,F.J. Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. *Food Microbiology*,21, 623-627, 2004.
- AKAN, M.; HAZIROGLU, R.; ILHAN, Z.; SAREYYÜPOGLU, B.; TUNCA, R. A case of 9 aspergillosis in a broiler breeder flock. *Avian Diseases*, v.42, n.2, p.497-501, april/june, 2002.
- BERNARDINI, E.; NASCIMENTO, J.S. Fungos anemófilos na praia do Laranjal, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Inst. Biol.,São Paulo*, v.72, n.1, p.93-7, 2005.
- BINDER,E.M.; TAN,T.M.; CHIN, L.J. HANDL,J. RICHARD,J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal feed science and technology*. 137, 265-282, 2007.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada Nº 274, d ANVISA, de 15 de outubro de 2002.

CAST. Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report N°139, Ames, Iowa, USA, 2003.

DALCERO,A., MAGNOLI,C., CHIACCHIERA,S., PALACIOS,G. and REYNOSO,M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 137, n. 3, p 179-184, 1997.

DALCERO,A.,MAGNOLI,C.,LUNA,M.,ANCASI,G.,REYNOSO,M.,CHIACCHIERA,S.,MIAZZO,R. and PALACIO,G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 141, n. 1, p 37-43, 1998.

DANTIGNY, P. ; GUILMART, A. ; BENSOUSSAN, M. Basis of predictive mycology. *Int. J.Food Microbiol.* 100, 187–196, 2005.

FAO.Almacenaje.2004.Disponível em:<<http://www.fao.org>> Acessado em: 23 set. 2010

FARIAS, A. X.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.3, p.617- 621, 2000.

FONSECA, H (2006). Os fungos e a deterioração de alimentos. Disponível: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acessado em: 27 jun. 2010.

GIMENO, A. (2000) Revision genérica del problema de los hongos y de las micotoxinas en la alimentación animal. Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>.> Acessado 2 abr. 2010.

GMP (Good Manufacturing Practices). Certification Scheme Animal Feed. Sector 2008, Appendix 1: *Product standards; Regulations on Product Standards in the Animal Feed Sector*. GMP14, p. 1- 39. 2008.

GUERRA, M.M. MARTINS, H.; GOUVEIA, M.F.; BERNADO,F. Aspectos da segurança sanitária dos alimentos compostos para cavalos. *Revista Portuguesa de Zootecnia*.ano/vol. XII, número 002, Vila Real, Portugal. PP. 63-75, 2005.

HASHIMOTO,E.H.;SANTOS,M.A.;ONO,E.Y.S.;HAYASHI,C.BRACARENSE,A.P.F.R.L.

HIROOKA, E.Y. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações

utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 24, n. 1, p. 123-132, jan./jun. 2003.

KABAK, B., DOBSON, A.D. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Rev Food Sci Nutr* 46, 593-619, 2006.

KAN, C.A.; MEIJER, G.A.L. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*. 133, 84-108, 2007.

KELLER, K.M.; QUEIROZ, B. D.; KELLER, L. A. M.; CAVAGLIERI, L.R.; PEREYRA, M.L.G.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. The mycobiota and toxicity of equine feeds. *Veterinary Research Communications*, v. 31, n. 8, p. 1037-1045, 2007.

KHANAFARI, A., SOUDI, H., MIRABOULFATHI, M. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production in corn. *Iranian J Environ Health Sci Engin* 4, 163-168, 2007.

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

MAGNOLI, C., ASTORECA, A., PONSONE, L., CHIACCHIERA, S., DALCEIRO, A. Ochratoxin A and the occurrence of ochratoxin A- producing black aspergilli in stored peanut seeds from Córdoba, Argentina. *J. Sci. Food Agric*, 86, 2369-2373, 2006.

MAGNOLI, C., CHIACCHIERA, S.M., MIAZZO, R., PALACIO, G., ANGELETTI, A., HALLAK, C., DALCERO, A. The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Córdoba, Argentina. *Mycotoxin Res.* 18, 7-22, 2002.

MAGNOLI, C. et al.. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 142, 27-32, 1998.

MANNING, B. B.; MENGHE, H. L.; ROBINSON, E. H.. Aflatoxins from moldy corn cause no reductions in channel catfish *Ictalurus punctatus* performance. *J. World Aqua. Society*, v. 36, n.1, p. 59-67, 2005.

MARTINS, H.M.; MARTINS, M.L. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal: 1996-1999). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 96(538):85-88, 2001.

- MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Toxicologia de alimentos. São Paulo: Varela, 2000. MURTHY, G.S., TOWNSEND, D.E., MEERDINK, G.L., BARGREN, G.L., TUMBLESÓN, M.E., Singh, V. Effect of aflatoxin B1 on dry-grind ethanol process. *Cereal Chem* 82, 302-304, 2005.
- NAYLOR, R.L., GOLDBURG, R.J., PRIMAVERA, J.H., KAUTSKY, N., BEVERIDGE, M.C.M., CLAY, J., FOLKE, L., LUBCHENCO, J., MOONEY, H. ; YROELL, M. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405:1017-1024, 2000.
- NUNES, E.M.C.G. *Microbiota fúngica nos ingredientes e em ração para piscicultura*. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina.
- OLIVEIRA, G.R.; RIBEIRO, J.M.M.; FRAGA, M.E.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; KELLER, K.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*. 162, 355-362, 2007.
- PEREIRA, M.M.G., CARVALHO, E.P., PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. *B. CEPPA*, 20(1):2002.
- PEREIRA, M. M. G. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil, *Ciênc. agrotec., Lavras*, v. 29, n. 1, p. 106-112, jan./fev. 2005.
- PITT, J.I. A Laboratory guide to common *Penicillium* species. 2 nd ed. Sydney, Australia: CSIRO, Division of Food Processing. 1988. 186p.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and spoilage. 2 ed. London: Blackie academic and Professional, 1999. 593p.
- RIBEIRO, J.M.M.; CAVAGLIERI, L.R.; VITAL, H.C.; KRUGER, C.D. ROSA, C.A.R. Radiação gama sobre a microbiota de ração avícola e *Aspergillus* spp. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online, 2009.
- RIBEIRO, S.A.A.L.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S. e LIMA, D.M.M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. *Revis. Brasil. Bot.*, vol. 26, n.2, p. 223-229. 2003.

- ROSA, C. A.R. et al. Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Veterinary Microbiology*, v. 113, n.1-2, p.89-96, 2006.
- ROSSETTO, C. A.; SILVA, O. F.; ARAÚJO, A. E. S. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. *Ciência Rural*, v.35, n.2, p.309-315, 2005.
- RUSSOMANNO, O.M.R.; ISIKAWA, P.M.; VALESAN, A.M.C.; MELINSKI, A.R.; HIPÓLITO, M. Fungos toxigênicos presentes em rações industrializadas destinadas à alimentação de cães e gatos. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.69, p.85, 2002. Suplemento. REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 15., 2002, São Paulo, Resumo 122.
- SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K.; NETTO, D. P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na região Norte do Estado do Paraná. *Semina*, v.24, p.63-72, 2003.
- SCUSSEL, V.M. (2002). Fungos em grãos armazenados. In: Lorini, I., Miike, LH, Scussel, VM Armazenagem de grãos. IBG (Campinas, São Paulo, Brasil), 675-804.
- SIGMA STAT for windows version 1.0. Jandel Corporation, 1994.
- SIMAS, M. M.; BOTURA M. B.; CORREA, B. Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. *Food Control*, v.18, p. 404-408, 2007.
- TRUCKSESS, M.W., STACK, M.E., NESHIM, S., ALBERT, R.H., ROMER, T.R. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachionuts: collaborative study. *J AOAC* 1994. Int 6, 1512-1521.
- WILLIAMS, D. E.; ORNER, G., WILLARD, K.D., TILTON, S., HENDRICKS, J.D., PEREIRA, C., BENNINGHOFF, A.D., Bailey, G.S. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and ultra-low dose cancer studies. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*149 (2), 175–181, 2009.

YANAKA, E.K. et al. Avaliação da presença de micotoxinas em milho e rações destinadas à avicultura comercial de postura nas regiões norte e noroeste do Estado do Paraná. *Pesq. Vet. Bras.*, v.24, supl.1, p.79, 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCENSI, F., ABARCA, M.L, CABAÑES, F.J. Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. *Food Microbiology*, 21, 623-627, 2004.
- AKAN, M.; HAZIROGLU, R.; ILHAN, Z.; SAREYYÜPOGLU, B.; TUNCA, R. A case of 9 aspergillosis in a broiler breeder flock. *Avian Diseases*, v.42, n.2, p.497-501, april/ june, 2002.
- AZIZ, N.H.; MATTER, Z.A.; SHAHIN, A.A.M. Detection of fumonisin B1 produced by *Fusarium moniliforme* and its control by gamma radiation and food preservatives. *Nat. Egypt. J. Microbiol.*, 10, 96–107, 2005.
- BAHT, 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.
- 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.
- BERNARDINI, E.; NASCIMENTO, J.S. Fungos anemófilos na praia do Laranjal, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.72, n.1, p.93-7, 2005.
- BINDER, E.M.; TAN, T.M.; CHIN, L.J. HANDL, J. RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal feed science and technology*. 137, 265-282, 2007.
- BINTVIHOK, A., PONPORNPIKIT, A., TANGTRONGPIROS, J., PANICHKRIANGKRAI, W., RATTANAPANEE, R., DOI, K., KUMAGAI, S. Aflatoxin contamination in shrimp feed and effects of aflatoxin addition to feed on shrimp production. *J. Food Prot.* 66 (5), 882–885, 2003.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada Nº 274, d ANVISA, de 15 de outubro de 2002.
- CALVET, R.M. Isolamento e identificação de fungos toxígenos em carcinicultura marinha. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina.
- CAST. Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, 2003. Task Force Report Nº139, Ames, Iowa, USA.
- CAZANAVE, S. O. S.; MÍDIO, A. F. A simplified method for the determination of zearalenone in corn-flour. *Alimentaria*, v. 298, p. 27-9, 1998.

- CHIOTTA, M.L.; PONSONE, M.L.; COMBINA, M. TORRES, A.M.; CHULZE, S.N. Aspergillus section Nigri species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 136, 137–141, 2009.
- CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, Amsterdam, n. 1/2, p. 1-10, Jan. 2002.
- DALCERO, A., MAGNOLI, C., CHIACCHIERA, S., PALACIOS, G. and REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 137, n. 3, p 179-184, 1997.
- DALCERO, A., MAGNOLI, C., LUNA, M., ANCASI, G., REYNOSO, M., CHIACCHIERA, S., MI AZZO, R. and PALACIO, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 141, n. 1, p 37-43, 1998.
- DANTIGNY, P. ; GUILMART, A. ; BENSOUSSAN, M. Basis of predictive mycology. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 187–196, 2005.
- DESJARDINS, A.E., 2006. *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- DILKIN, P.; MALLMANN, C.A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In. ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11., 2004, São Paulo. Anais. São Paulo, 2004.
- EATON, D. L., GROOPMAN, J. D., 1994. *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. Academic Press, San Diego, California.
- EL-SAYED, Y.S.; KHALIL, R.H. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B1 in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1606–1609, 2009.
- EMBRAPA. Suplementação direta de microorganismos e seus extratos. Embrapa Gado de Corte. <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc106/08microorganismos.html>. acesso em 27 de novembro de 2010.
- FAO. Almacenaje. 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acessado em: 23 set. 2010
- FARIAS, A. X.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.3, p.617- 621, 2000.
- FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L.; MANSILLA, M.L.; TADEO, J.L. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1, 113–122, 2010
- FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H.F. et al. Aflatoxinas: um risco à saúde animal. *Ambiência*, v.2, n.1, p.113-127, 2006.
- FIGUEIRA, E. L. Z. COELHO, A.R. ; ONO, E.Y.S. HIROOKA, E.Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. *Semina: Ciências Agrárias*, v.24, n.2, p.359-378, 2003.

FONSECA, H (2006). Os fungos e a deterioração de alimentos. Disponível: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acessado em: 27 jun. 2010.

GIMENO, A. Revision genérica del problema de los hongos y de las micotoxinas en la alimentación animal. 2000 Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>.> Acesso em 2 abr. 2008.

GMP (Good Manufacturing Practices). Certification Scheme Animal Feed. Sector 2008, Appendix 1: *Product standards; Regulations on Product Standards in the Animal Feed Sector*. GMP14, p. 1- 39. 2008.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M.M.; MANGINELLI, S.; FELICIO, J.D. Intoxicação de vacas leiteiras por farelo de algodão naturalmente contaminado com aflatoxinas. *Revista Ciência Rural*, v.34, n.1, p.171-174, 2004.

GONZÁLEZ PEREYRA, M.L.; ALONSO, V.A.; SAGER, R.; MORLACO, M.B.; MAGNOLI, C.E.; ASTORECA, A.L.; ROSA, C.A.R.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1034–1041, 2009.

GUERRA, M.M. MARTINS, H.; GOUVEIA, M.F.; BERNADO, F. Aspectos da segurança sanitária dos alimentos compostos para cavalos. *Revista Portuguesa de Zootecnia*.ano/vol. XII, número 002, Vila Real, Portugal. PP. 63-75, 2005.

HASHIMOTO, E.H.; SANTOS, M.A.; ONO, E.Y.S.; HAYASHI, C. BRACARENSE, A.P.F.R.L. HIROOKA, E.Y. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 24, n. 1, p. 123-132, jan./jun. 2003.

HENDRICKS, J. D. Carcinogenicity of aflatoxins in non-mammalian organisms. In: Eaton, D.L., Groopman, J.D. (Eds.), *Toxicology of Aflatoxins: Human Health Veterinary and Agricultural Significance*. Academic Press, San Diego, pp. 103–136, 1994.

HERMANN, G.; PINTO, F.T.; KITAZAWA, S.E.; NOLL, I.B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 26(1): 7-10, jan.-mar. 2006.

HUMPF, H. U.; VOSS, K. A. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol. Nutr. Food Res.* 48, 255–269, 2004

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicol.* 167, 101-134, 2001.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC, 1993. 571p.

JANTRAROTAI, W.; LOVELL, R.T.; GRIZZLE, J.M., Acute toxicity of dietary aflatoxin B1 to channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health* 2 (4), 237–247, 1990

JAY, J. M. Microbiologia de alimentos. 6 ed. Porto Alegre. Artmed, 2005.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluations on certain mycotoxins in food 2001. Acesso em 10 set. 2010. Online. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>.

KABAK, B., DOBSON, A.D. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Rev Food Sci Nutr* 46, 593-619, 2006.

KAN, C.A.; MEIJER, G.A.L. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*. 133, 84-108, 2007.

KATTA, S. K.; CAGAMPANG, A.E.; JACKSON, L.S.; BULLERMAN, L.B. Distribution of *Fusarium* molds and fumonisins in dry-milled corn fractions. *Cereal Chem.* 1997, 74, 858–863.

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V.; MASSAGUER, P. R. The development of an analytical method for two micotoxins, patulin and verruculagem, and survey of their presence in commercial tomato pulp. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, p.269-273, 2002.

KELLER, K.M.; QUEIROZ, B. D.; KELLER, L. A. M.; CAVAGLIERI, L.R.; PEREYRA, M.L.G.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. The mycobiota and toxicity of equine feeds. *Veterinary Research Communications*, v. 31, n. 8, p. 1037-1045, 2007.

KHANAFARI, A., SOUDI, H., MIRABOULFATHI, M. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production in corn. *Iranian J Environ Health Sci Engin* 4, 163-168, 2007.

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

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO, Division of food research Sydney, academic Press, Austrália, 1988.

LESLIE, J.F., SUMMERELL, B.A. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 2006.

LOGRIECO, A.; MULÉ, G.; MORETTI, A.; BOTTALICO, A. Toxogenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 597–609, 2002

MAGNOLI, C., DALCERO, A., CHIACCIERA, S.M., MIAZZO, R., SÁENZ, M. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 142, 27–32, 1998

MAGNOLI, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; COMBINA, M.; PALÁCIO, G.; ROSA, C.A.R.; DALCERO, A.M. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Letters in Applied Microbiology* 39, 326–334, 2004.

MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; CHIACCIERA, S.; DALCERO, A. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. *Mycopathologia* 161, 53–58, 2006.

- MANNING, B. B.; MENGHE, H. L.; ROBINSON, E. H.. Aflatoxins from moldy corn cause no reductions in channel catfish *Ictalurus punctatus* performance. *J. World Aqua. Society*, v. 36, n.1, p. 59–67, 2005.
- MARASAS, W.F.O., RILEY, R.T., HENDRICKS, K.A., STEVENS, V.L., SADLER, T.W., GELINEAU-VAN WAES, J., MISSMER, S.A., CABRERA, J., TORRES, O., GELDERBLUM, W.C.A., ALLEGOOD, J., MARTINEZ, C., MADDOX, J., MILLER, J.D., STARR, L., SULLARDS, M.C., ROMAN, A., VOSS, K.A., WANG, E., MERRIL, A.H., 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin contaminated maize. *J. Nutr.* 134, 711–716.
- MARTINS, H.M.; MARTINS, M.L. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal:1996-1999). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 96(538):85-88, 2001.
- MAZZO, R.; PERALTA, M.F.; MAGNOLI, C. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. *Poultry Science*, v.84, p.1-8, 2005.
- MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Toxicologia de alimentos. São Paulo: Varela, 2000.
- MISSMER, S. A.; SUAREZ, L.; FELKNER, M.; WANG, E.; MERRILL, A. H., Jr.; ROTHMAN, K. J.; HENDRICKS, K. A. Exposure to fumonisin and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. *Environ. Health Perspect*, 114, 237–241, 2006.
- MORENO, E.C.; GARCIA, G.T.; ONO, M.A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y.S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Chemistry*, 116, 220–226, 2009.
- MURTHY, G.S., TOWNSEND, D.E., MEERDINK, G.L., BARGREN, G.L., TUMBLESON, M.E., Singh, V. Effect of aflatoxin B1 on dry-grind ethanol process. *Cereal Chem* 82, 302-304, 2005.
- NAYLOR, R.L., GOLDBURG, R.J., PRIMAVERA, J.H., KAUTSKY, N., BEVERIDGE, M.C.M., CLAY, J., FOLKE, L., LUBCHENCO, J., MOONEY, H. ; YROELL, M. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405:1017-1024, 2000.
- NUNES, E.M.C.G. Microbiota fúngica nos ingredientes e em ração para piscicultura. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina
- OGIDO R. OLIVEIRA, C.A. ; LEDOUX, D.R. Effects of prolonged administration of aflatoxins B1 and fumonisin B1 in laying Japanese quail. *Poultry Science*, v.83, p.1953-1958, 2004.
- OLIVEIRA, C.A.F.; SEBASTIÃO, L.S.; ROSIM, R.E.; FAGUNDES, H.; FERNANDES, A.M. Ocorrência simultânea de aflatoxina e ácido ciclopiazônico em rações para vacas leiteiras. *Revista Analytica*. Agosto/Setembro, 24, 88-92, 2006.

- OLIVEIRA, G.R.; RIBEIRO, J.M.M.; FRAGA, M.E.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; KELLER, K.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*. 162, 355-362, 2007.
- PEREIRA, M.M.G., CARVALHO, E.P., PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. *B. CEPPA*, 20(1):2002.
- PEREIRA, M. M. G. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil, *Ciênc. agrotec., Lavras*, v. 29, n. 1, p. 106-112, jan./fev. 2005.
- PITT, J.I. A Laboratory guide to common *Penicillium* species. 2nd ed. Sydney, Australia: CSIRO, Division of Food Processing. 1988.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and spoilage. 2^{ed}. London: Blackie academic and Professional, 1999.
- REDDY, K.R.N.; REDDY, C.S.; MURALIDHAREN, K. Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in rice in India. *Food Microbiology* 26, 27–31, 2009.
- RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of Fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2101–2105, 2002.
- RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, Lancaster, v.82, p.253-257, 1992.
- RIBEIRO, J.M.M.; CAVAGLIERI, L.R.; VITAL, H.C.; KRUGER, C.D. ROSA, C.A.R. Radiação gama sobre a micobiota de ração avícola e *Aspergillus* spp. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online, 2009.
- RIBEIRO, S.A.A.L.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S. e LIMA, D.M.M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. *Revis. Brasil. Bot.*, vol. 26, n.2, p. 223-229. 2003.
- ROIGÉ, M.B.; ARANGUREN, S.M.; RICCIO, M.B.; PEREYRA, S.; SORACI, A.L. TAPIA, M.O. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Rev. Iberoamericana Micol.* 26(4):233–237, 2009.
- ROSA, C. A.R. RIBEIRO, J.M.M.; FRAGA, M.J.; GATTI, M.; CAVAGLIERI, L.R.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M.; LOPES, C.W.G. Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Veterinary Microbiology*, v. 113, n.1-2, p.89-96, 2006.
- ROSSETTO, C. A.; SILVA, O. F.; ARAÚJO, A. E. S. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. *Ciência Rural*, v.35, n.2, p.309-315, 2005.
- RUSSOMANNO, O.M.R.; ISIKAWA, P.M.; VALESAN, A.M.C.; MELINSKI, A.R.; HIPÓLITO, M. Fungos toxigênicos presentes em rações industrializadas destinadas à alimentação de cães e gatos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.69, p.85,

2002. Suplemento. REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 15., 2002, São Paulo, Resumo 122.
- SAMSON, A. R. et al. Introduction to food-and airborne fungi. Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Netherlands: Utrecht, 2001.
- SÁNCHEZ, MA. C. C., PALACIOS, C. A. M., MORENO, I. O.. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B1. *Aquaculture* 127 (1), 49–60, 1994
- SANTOS, F. C. F. Fungos em rações para camarões cultivados no Estado do Piauí. 2006. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina.
- SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K.; NETTO, D. P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na região Norte do Estado do Paraná. *Semina*, v.24, p.63- 72, 2003.
- SCHWARZER, K., 2009. Harmful effects of mycotoxins on animal physiology. In: 17th Annual ASAIM SEA Feed Technology and Nutrition Workshop, Hue, Vietnam.
- SCUSSEL, V.M. (2002). Fungos em grãos armazenados. In: Lorini, I., Miike, LH, Scussel, VM Armazenagem de grãos. IBG (Campinas, São Paulo, Brasil), 675-804.
- SIAME, B. A. , MPUCHANE, S.E., GASHE, B.A., ALLOTEY, G.F., TEFFERA, G. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B1 and zearalenone in foods and feeds in Botswana. *J Food Prot.*, v. 61, p. 1670–1673, 1998.
- SIGMA STAT for windows version 1.0. Jandel Corporation, 1994.
- SIMAS, M. M.; BOTURA M. B.; CORREA, B. Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. *Food Control*, v.18, p. 404-408, 2007.
- TRABULSI, L. R. Et al. Microbiologia médica. São Paulo: Atheneu. 2002. p. 586.
- TRISTAN, T.Q. Dinâmica toxicológica de aflatoxinas em alimentos de origen animal em Aguascalientes y Querétaro. Santiago de Querétaro: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Edicion Comunicación del Centro, 2002.
- TRUCKSESS, M.W., STACK, M.E., NESHIM, S., ALBERT, R.H., ROMER, T.R. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachionuts: collaborative study. *J AOAC* 1994. Int 6, 1512-1521.
- WELKE, J.E.; HOELTZ, M.; NOLL, I.B. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e acratoxina A em vinhos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.8, p. 2567-2575, Nov, 2009.
- WILLIAMS, J.H.. PHILLIPS, T.D., JOLLY, P.E., STILES, J.K., JOLLY, C.M., AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1106–1122, 2004.

WILLIAMS, D. E.; ORNER, G., WILLARD, K.D., TILTON, S., HENDRICKS, J.D., PEREIRA, C., BENNINGHOFF, A.D., Bailey, G.S. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and ultra-low dose cancer studies. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 149 (2), 175–181, 2009.

YANAKA, E.K. ; NETTO, D.P. ; SASSAHARA, M. Avaliação da presença de micotoxinas em milho e rações destinadas à avicultura comercial de postura nas regiões norte e noroeste do Estado do Paraná. *Pesq. Vet. Bras.*, v.24, supl.1, p.79, 2004.