



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**POTENCIAL DE TOXICIDADE DE MICROFUNGOS ISOLADOS DE RAÇÕES  
PARA PEIXES FABRICADAS NO ESTADO DO AMAZONAS**

**HÉRLON MOTA ATAYDE**

**MANAUS  
2008**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**HÉRLON MOTA ATAYDE**

**POTENCIAL DE TOXICIDADE DE MICROFUNGOS ISOLADOS DE RAÇÕES  
PARA PEIXES FABRICADAS NO ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência de Alimentos, da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do grau Mestre em Ciência de Alimentos.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Francisca Simas Teixeira**

**MANAUS  
2008**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

A862 p Atayde, Hérlon Mota  
Potencial de toxicidade de microfungos isolados de rações para peixes fabricadas no Estado do Amazonas / Hérlon Mota Atayde. - 2008. 55 f. ; 31 cm.  
Dissertação (mestrado em Ciência de Alimentos) — Universidade Federal do Amazonas.  
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Francisca Simas Teixeira.

1. Peixe – Alimentação e rações 2. Rações – Análise 3. Micotoxinas  
4. Peixe – Criação - Amazonas 5. Alimentos - Toxicologia  
I. Teixeira, Maria Francisca Simas, orientador II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (2007): 639.3.043(811.3)(043.3)

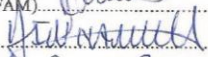


UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Ata da Defesa Pública da Dissertação de Mestrado do aluno **Hérton Mota Atayde**, do Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, área de concentração em Ciência de Alimentos, realizada no dia trinta e um de março de dois mil e oito.

Aos trinta e um dias do mês de março do ano de dois mil e oito, às nove horas, no auditório rio Jutai da Faculdade de Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Hérton Mota Atayde realizou a defesa pública de sua Dissertação de Mestrado intitulada: **“POTENCIAL DE TOXICIDADE DE MICROFUNGOS ISOLADOS DE RAÇÃO PARA PEIXES FABRICADA NO ESTADO DO AMAZONAS”**. Compuseram a banca examinadora os seguintes Professores Doutores: Maria Francisca Simas Teixeira (Orientadora – Universidade Federal do Amazonas), Antonio José Inhamuns da Silva (Universidade Federal do Amazonas) e Maria Fulgência Lima Bandeira (Universidade Federal do Amazonas). A apresentação foi seguida de arguição do candidato. Tendo respondido satisfatoriamente às questões formuladas pela comissão examinadora, a Dissertação foi considerada **“APROVADA”**, sendo-lhe concedido o título de MESTRE em Ciência de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos. Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, Manaus - AM, aos trinta e um dias do mês de março do ano de dois mil e oito.

Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira (ORIENTADORA - UFAM) 

Prof. Dr. Antonio José Inhamuns da Silva (UFAM) 

Profa. Dra. Maria Fulgência Lima Bandeira (UFAM) 

## **DEDICATÓRIA**

*Chorava com minhas partidas, mas aos pouquinhos, amadureceu e compreendeu as responsabilidades do adulto. Sempre com grande alegria e um cativante sorriso no rosto me recebia na chegada ao lar. Diante da inocência de menino, como ninguém perdoou minhas ausências. Todos os melhores frutos desse trabalho eu dedico a ti, Dimitry (meu filho!).*

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Nosso Deus, muitíssimo obrigado por todas as graças alcançadas. Carinhosamente agradeço por colocar cada pessoa (abaixo citadas ou não) no meu caminho. Reconheço que somente Tu sabes direcionar os bons corações aos necessitados. Segundo Tua vontade, abençoa todos da mesma forma ou ainda muito mais do que sou abençoado. Amém!

Ao exemplo de amor à ciência, adoção maternal, criticidade e sincera amizade declarada, a minha (e espero que ainda seja de muitos outros!) “mãe científica” Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Francisca Simas Teixeira. Brava, mas com um coração de diamante!

Aos meus pais, Raimundo e Doracy Atayde e demais parentes, por tudo!

Sem ter noção da empreitada, acatou meu desejo de cursar Mestrado. Somou seu companheirismo e entendeu as minhas ausências. Compartilhou das dificuldades e alegrou-se com as vitórias conquistadas. Pelo entendimento conquistado, dedicação e, principalmente, amor dispensado, agradeço à minha esposa, Jaqueline.

A todos os colegas do mestrado, pela pouca, mas saudosa convivência: Aline Guimarães, Carolina Queiroga, Cássia Sobreira, Elizalane Araújo, Keli Siqueira, Ximena Bardales, Mirian Cartonilho, Nina Laredo, Ricardo Caxias, Sheila Luz, Shirley Gonçalves, Tânia Batista, Ricardo Caxias e Wallace Batista. Especialmente, Antônio Fábio Lopes, pela enorme amizade e presteza, sempre.

Aos colegas do Laboratório de Micologia: Josie Caldas, Larissa Kirsch, Lorisa Simas, Maria Ivone Lopes, Michel Martins, Ormezinda Fernandes, Rosana Palheta, Teresa Castillo. As pequenas diferenças fazem parte de uma família, assim como as ainda mais memoráveis diversões para aliviar o cansaço.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia do Pescado: Aline Sousa, Antonio Inhamuns, Daphne Alves, Joelcio Avelar, Laécio Pardo, Ricardo Aparício e demais componentes dessa grande família, sempre pela cordialidade e comovente priorização dada aos trabalhos desse intruso adotado.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia: Eduardo Braga, Felipe Souza, Januário Gama, Nelly Vinhote, Takeshi Matsuura, pela prestimosa parceria.

Aos demais alunos, técnicos e professores dos vários laboratórios da UFAM (Química, Bioquímica, Farmacologia, Histologia, Citologia e Limnologia) pela cessão de materiais em momentos de urgência.

Pela torcida de tantos outros, entre os quais Adriana Rogéria Lago, Ana Lúcia Basílio, Ariane Carneiro, Edson Lessi, Elton Brito, Eraclides Teixeira, Família João Valente (Beth, Neide, Telma e demais companheiras), Ivanilde Araújo, Jerusa Andrade, Karina Suzana Gomes, Lúcia Góes de Araújo, Marle Villacorta-Corrêa, Noemia Ishikawa, Otávia Santos, Rogério de Jesus, Socorro Rocha, Vandrezza Sodré, Valéria Sobral, Viviane Fernandes, ... , tantos!

Às bibliotecárias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Setor Sul, pela paciência.

Aos empresários das fábricas de ração do Amazonas, pela importante colaboração na execução desse trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, principalmente Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ila Maria de Aguiar Oliveira, pela sempre terna atenção dispensada.

À Secretaria Municipal de Educação (SEMED) pela liberação concedida, pelo investimento nos seus profissionais através do Programa QUALIFICA, visando a melhoria da qualidade de ensino.

Ao Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela parceria estabelecida com a UFAM, sempre cedendo espaço e profissionais para o avanço da ciência na Amazônia.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela luta para manutenção das atividades do programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, procurando a valoração pelos seus participantes diretos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em particular à Coordenação de Apoio a Pesquisa (CAPES) pelo apoio financeiro durante a execução desse trabalho.

## RESUMO

Microfungos em ração animal podem produzir metabólitos prejudiciais à produtividade, especialmente em sistemas de criação intensiva. Os efeitos deletérios podem atingir o consumidor final, ou seja, o homem. Nesse estudo, amostras de ração extrusada para peixes, produzidas no Amazonas-Brasil (fábricas F1 e F2; n=15 cada) tiveram a microbiota quantificada e identificada. Alguns isolados (n=29) foram caracterizados quanto à toxicidade contra *Artemia salina*; adicionalmente, pH e umidade foram comparados às condições favoráveis ao desenvolvimento fúngico. Para isolamento e quantificação, diluições decimais foram inoculadas em ágar rosa bengala cloranfenicol, em triplicata, incubados a 25 °C/7 dias. Obtiveram-se índices de UFC/g (F1=1,45x10<sup>2</sup>; F2=3,77x10) abaixo do limite estabelecido para alimentação animal (10<sup>5</sup> UFC/g). Umidade (F1=8,82%; F2=8,21%) e pH (F1=6,64; F2=6,66) foram adequados ao crescimento de fungos, especialmente xerófilos. Foram isoladas 881 colônias (F1=85,5%, F2=14,5%) e identificadas 15 espécies, com maior prevalência de *Penicillium implicatum*(F1=22,5%; F2=4,0%), *Penicillium janczewskii*(F1=22,4%; F2=4,1%) e *Penicillium melinii*(F1=21,9%; F2=4,0%). Extratos aquosos brutos foram submetidos a duas formas de bioensaio de toxicidade – com disco de papel de filtro(CDPF) e sem disco de papel de filtro(SDPF) – que confirmaram a sensibilidade da *Artemia* aos mico-metabólitos. Apesar de resultados diferenciados em alguns isolados, estatisticamente, bioensaios utilizando extratos aquosos não são influenciados pelo uso do disco de papel de filtro. Apesar da boa qualidade das rações extrusadas, a ocorrência desses microrganismos é preocupante devido a grave bioatividade dos extrólitos produzidos pelos isolados e relativa estabilidade de mico-metabólitos ao processamento de alimentos, significando riscos à produtividade, saúde animal e consumidores de peixes cultivados.



## RESUMO

Microfungi in animal feed can produce metabolites detrimental to productivity, especially in intensive farming systems. Deleterious effects can reach the final consumer – the man. In this study, samples of extruded fish feed produced in Amazonas, Brazil (factories F1 and F2, n = 15 each) had the mycobiota identified and quantified. Some isolates (n=29) were characterized for toxicity against *Artemia salina*; additionally pH and moisture were compared at favorable conditions to fungal development. For isolation and quantification, decimal dilutions were inoculated on rose bengal chloramphenicol agar, in triplicate, incubated at 25 °C / 7 days. Obtained cfu/g (F1=1.45x10<sup>2</sup>, F2=3.77x10) below the threshold for animal feed (10<sup>5</sup> cfu/g). Humidity (F1=8.82%, F2=8.21%) and pH (F1=6.64, F2=6.66) were suitable to fungi growth, especially xerophilic. 881 colonies were isolated (F1=85.5%, F2=14.5%) and 15 species identified, with a higher prevalence of *Penicillium implicatum* (F1=22.5%, F2=4.0%), *Penicillium janczewskii* (F1=22.4%, F2=4.1%) and *Penicillium melinii* (F1=21.9%, F2=4.0%). Crude aqueous extracts were submitted to two types of toxicity bioassay - with presence (DPFP) and absence (DPFA) paper filter disc - which confirmed the *Artemia salina* sensitivity to myco-metabolites. Although mixed results in some isolates of *Absidia cylindrospora* and *P. janczewskii* (toxic when DPFP, highly toxic when DPFA). Nevertheless, statistically, bioassays aqueous extracts are not influenced by paper disk filter presence. Despite the good quality of extruded feed, these microorganisms occurrence is worrying due severe bioactivity of extrolits from isolates and relative metabolites stability to food processing, meaning risks to productivity, animal health and consumers of farmed fish.

## SUMÁRIO

<i>ARTIGO DE REVISÃO</i> .....	10
<b>FUNGOS TOXIGÊNICOS E MICOTOXINAS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL</b> .....	10
INTRODUÇÃO.....	10
Aspectos gerais sobre fungos em alimentos .....	12
Aspectos gerais sobre fungos em alimentos.....	12
Micotoxinas em produtos agrícolas.....	17
Características e importância das aflatoxinas para a saúde animal.....	18
Micotoxinas em ração para peixes.....	22
Processamentos de alimentos <i>versus</i> micotoxinas.....	24
Efeito da extrusão nas micotoxinas.....	27
Legislação brasileira relacionada a micotoxinas em alimento.....	28
Bioensaios de toxicidade utilizando <i>Artemia</i> .....	32
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
REFERÊNCIAS: .....	34
<i>ARTIGO CIENTÍFICO</i> .....	41
<b>QUANTIFICAÇÃO DE MICROFUNGOS DA RAÇÃO COMERCIAL PARA PISCICULTURA TROPICAL E EFEITO TÓXICO DOS EXTRATOS EM <i>Artemia</i></b> ...	41
INTRODUÇÃO.....	42
METODOLOGIA .....	43
Amostragem.....	43
Isolamento e identificação dos fungos .....	44
Teste de toxicidade utilizando <i>Artemia salina</i> .....	45
Determinação da umidade e pH da ração extrusada .....	46
Análise estatística .....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
CONCLUSÃO .....	52
REFERÊNCIAS .....	53

## FUNGOS TOXIGÊNICOS E MICOTOXINAS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Hérлон Mota ATAYDE<sup>1</sup>, Ila Maria de Aguiar OLIVEIRA<sup>2</sup>; Maria Francisca Simas TEIXEIRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Engenheiro de Pesca – Mestre em Ciência de Alimentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas(FCF) – Universidade Federal do Amazonas(UFAM).

<sup>2</sup> Farmacêutica-bioquímica – Doutora em Ciência de Alimentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas(FCF) – UFAM.

<sup>3</sup> Bióloga – Doutora em Ciências Biológicas (área: Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – UFAM.

### RESUMO:

Certas espécies de fungos filamentosos produzem compostos tóxicos denominados micotoxinas que, ao serem ingeridas, podem causar micotoxicoses em animais, inclusive ao homem. Entre os fungos micotoxigênicos, os de maior ocorrência em produtos alimentícios são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que exigem condições específicas e restritas para o crescimento e produção de micotoxinas. Experimentos realizados com animais comprovaram a ação nociva dessas toxinas, como redução do peso corporal, efeitos mutagênico, carcinogênico e/ou teratogênico. Este artigo apresenta uma revisão sobre os principais aspectos da atividade biológica e toxicológica dos fungos filamentosos em alimentos, enfatizando-os como agentes micotoxigênicos para animais, inclusive como contaminantes de ração para peixes.

Palavras-chave: Fungos. Micotoxinas. Aflatoxinas. Ração. Alimento.

### INTRODUÇÃO

A contaminação de produtos alimentícios por fungos toxigênicos e toxinas, nas últimas décadas, tem sido tratada com maior atenção. A freqüente ocorrência de micotoxinas em produtos agrícolas tem potencial impacto negativo na economia regional, especialmente nos países em desenvolvimento. A prevenção do crescimento desses microrganismos em produtos agrícolas está associada às técnicas de colheita e pós-colheita, as quais são raramente praticadas conjuntamente com instalações adequadas de armazenagem (ATANDA et al., 2006).

Micotoxinas são metabólitos secundários que não tem significado bioquímico para o desenvolvimento de certos fungos filamentosos, contudo atuam como compostos competitivos favorecendo sua sobrevivência e são capazes de induzir reação tóxica (micotoxicose) em vários animais. Atualmente são conhecidas mais de 300 micotoxinas, entre as quais um pequeno número tem relevância devido causarem problemas de saúde pública, inclusive de natureza mutagênica, carcinogênica e/ou teratogênica (CAZZANIGA et al., 2001; BENNET; KLICH, 2003; BOUDRA; MORGAVI, 2005; BINDER, 2007).

*Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são fungos toxigênicos por serem fontes de aflatoxinas, fumonisinas e ocratoxinas, que causam efeito carcinogênico e imunotóxico, entre outros (SCUSSEL, 2000; CREPPY, 2002; ACCENSI et al., 2004; SANTACROCE et al., 2008).

As aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujo nível máximo (20 µg/kg) está estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996) e Ministério da Saúde (BRASIL, 2002), legislações que ignoram a importância do efeito tóxico combinado de outras micotoxinas nocivas tanto para o homem quanto aos demais animais (SPEIJERS; SPEIJERS, 2004).

Apesar de constituir dado não disponível na literatura, uma importante consideração deve ser feita quanto à contaminação humana indireta pelo consumo de peixes provenientes de piscicultura intensiva, alimentados com ração contaminada por micotoxinas (HASHIMOTO et al., 2003).

Os peixes, na piscicultura intensiva, dependem totalmente da alimentação fornecida pelo homem para crescimento e sobrevivência (KUBITZA, 1999). Por vez, uma melhor qualidade dessas rações depende do controle sanitário dos insumos

utilizados na fabricação, os quais são muito suscetíveis ao ataque microbiano, principalmente por fungos, inclusive os micotoxigênicos (HASHIMOTO et al., 2003).

O crescente interesse e aprimoramento de conhecimentos técnicos em relação à piscicultura intensiva demandam a utilização de rações comerciais preferencialmente extrusadas, produto ao qual se atribui um balanceamento energético adequado, o que minimiza problemas no desempenho zootécnico (SILVA et al., 2003).

No entanto, dados sobre a ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em rações para peixe são escassos. Dada a importância dos fungos, esta revisão apresenta os principais aspectos referentes a atividade biológica e toxicológica desses microrganismos em produtos agrícolas e na alimentação animal, com ênfase em ração para peixes.

### **Aspectos gerais sobre fungos em alimentos**

Fungos são microrganismos eucariontes, desenvolvem-se em ambientes aeróbios ou micro-aeróbios e sobrevivem em uma ampla faixa de temperatura (entre -6 °C e 90 °C). Reproduzem-se, sexuada ou assexuadamente e têm forma de vida diversificada (parasitas, simbiontes e saprotróficos) (AINSWORTH; SUSSMAN, 1965; SILVEIRA, 1995; TEIXEIRA et al., 1999).

Além disso, os fungos são quimiorganotróficos, necessitam de compostos orgânicos como fontes de energia, realizam digestão extracelular e os nutrientes provenientes dessa atividade são absorvidos pela célula e/ou acumulados na forma de glicogênio. Sobrevivem em ambientes com altas concentrações de açúcar (osmofílicos) ou altas concentrações de sal (halofílicos) (DEACON, 1997; TEIXEIRA et al., 1999).

Os fungos degradam matéria orgânica *in vivo* e *in vitro*, processo que proporciona a reciclagem de nutrientes e disponibilização de compostos que podem ser utilizados durante o ciclo vital (DEACON, 1997). Na metabolização desses compostos, etapa denominada de metabolismo primário, são produzidas substâncias necessárias (ácidos láctico, cítrico, glucônico e álcool etílico, entre outros) para estrutura e funcionamento celular (GRIFFIN, 1993; DEACON, 1997).

No final da fase exponencial de crescimento, influenciados pelas condições do substrato, os fungos produzem outras enzimas e substâncias não-essenciais (toxinas, antibióticos, pigmentos, entre outros) para crescimento e reprodução. O processo de formação destes compostos denomina-se metabolismo secundário e têm atraído a atenção de pesquisadores em todo o mundo devido o impacto na saúde humana, produtividade animal e comércio nacional e internacional (MARTÍN et al., 2005; LEUNG et al., 2006).

Alimentos ricos em nutrientes, associados às demais características intrínsecas e condições ambientais, são excelentes substratos para fungos (Quadro 1). O desenvolvimento não controlado desses microrganismos em alimentos *in natura* ou subprodutos ocasiona a degradação dos nutrientes e alterações organolépticas que comprometem a qualidade nutricional e econômica desses produtos (YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002; ATAYDE et al., 2005).

De forma particular, os principais fatores que influenciam na colonização de fungos em alimentos são temperatura, umidade do substrato, processamento, produção, atmosfera de armazenamento e agentes competidores. Dentre esses, a umidade, a temperatura e a oxigenação são condições que propiciam a germinação e a multiplicação dos esporos de certos fungos toxigênicos, a exemplo de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*, capazes de produzir micotoxinas, metabólitos

tóxicos, com estrutura química e de propriedades biológicas diferenciadas (CAZZANIGA et al., 2001; HUSSEIN; BRASEL, 2001; YANNIKOURIS; JOUANY, 2002; BENNETT; KLICH, 2003; BAPTISTA et al., 2004; FERREIRA et al., 2006; LEUNG et al., 2006).

FUNGOS TOXIGÊNICOS	SUBSTRATO	MICOTOXINAS
<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Amendoim, amêndoas, castanha do Pará, nozes, cereais, coco, sementes de algodão.	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>
<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Leite	M <sub>1</sub>
<i>Fusarium oxysporum</i> <i>F. roseum</i> , <i>F. lacteritium</i> <i>F. tricinctum</i> , <i>F. moniliforme</i>	Milho, trigo	Zearalenona
<i>Aspergillus</i> sp. <i>Penicillium expansum</i>	Frutas em geral, trigo, cevada germinada.	Patulina
<i>F. tricinctum</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. poae</i> , <i>Stachybotrys</i> sp.	Grãos, feno, rações, <i>corn flakes</i>	Tricotecenos
<i>F. graminearum</i> , <i>Trichotecium</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	Cereais	Deoxinivalenol Nivalenol Zearalenona
<i>Myrothecium</i> sp, <i>Trichotecium</i> sp.	Cereais	Nivalenol
<i>Cephalosporium</i> sp.	Cereais	Toxina T <sub>2</sub>
<i>A. alutaceus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. esclerotiorum</i> , <i>P. variable</i> , <i>P. purpurecens</i> , <i>P. viridicatum</i>	Cereais, café, farinha de mandioca, ração animal.	Ocratoxina
<i>Penicillium</i> sp.	Cereais	Ácido penicílico
<i>A. versicolor</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. rugulosus</i> , <i>A. chevalieri</i>	Cereais, frutas, café, sucos e queijos.	Esterigmatocistina
<i>Penicillium</i> sp.	Cereais	Rubratoxina A e B
<i>Penicillium</i> sp.	Arroz	Citroveridina
<i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> <i>F. nygamai</i>	Milho e arroz	Fumonisinias
<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Amendoim, milho, farinha de milho.	Citrinina

Quadro 1 – Fungos toxigênicos e micotoxinas encontrados em alimentos destinados a consumo humano ou animal

Fonte: Scussel, 1998; 2000; Hussein; Brasel, 2001.

Nesta contextualização, a literatura destaca que a condição ótima para o desenvolvimento de fungos não é necessariamente a ótima para produção de

micotoxina. Tal condição foi observada em análises realizadas com *A. flavus*, cujo crescimento ótimo ocorre a 33 °C, contudo produz micotoxina na faixa entre 13 °C e 42 °C. Para essa espécie, a atividade de água torna-se outro fator de grande interferência cujo teor ótimo para o crescimento corresponde a 0,98 enquanto para a produção de aflatoxina é exigido 0,82 e 1,00 (HUSSEIN; BRASEL, 2001; PEREIRA et al., 2002; BAPTISTA et al., 2004; FERREIRA et al., 2006).

A condição ótima para o desenvolvimento de fungos não é necessariamente a ótima para produção de micotoxina. Tal condição foi observada em análises realizadas com *A. flavus*, cujo crescimento ótimo ocorre a 33 °C, contudo produz micotoxina na faixa entre 13 °C e 42 °C. Para essa espécie, a atividade de água torna-se outro fator de grande interferência cujo teor ótimo para o crescimento corresponde a 0,98 enquanto para a produção de aflatoxina é exigido 0,82 e 1,00 (HUSSEIN; BRASEL, 2001; PEREIRA et al., 2002; BAPTISTA et al., 2004; FERREIRA et al., 2006).

Quanto à umidade, o teor necessário para síntese de aflatoxinas por fungos é variável e dependente do substrato (SCUSSEL, 2000). Milhos, oleaginosas e leguminosas são considerados suscetíveis a essa situação quando apresentam umidade absoluta entre 18-22%, 9-15% e 17-23%, respectivamente. Para estocagem desses grãos, recomenda-se para umidade crítica, isto é, a umidade ambiente na qual o alimento pode ser exposto sem grande absorção de água, entre 13-15,5, 7,0-8,0 e 12,0-16,5, respectivamente, sendo necessária a secagem 1-2% abaixo desses valores para tornar a estocagem mais segura, ainda aliada à secagem homogênea, quebra dos grãos, ausência de roedores e boa ventilação no local de armazenamento (SCUSSEL, 2000).



A presença de fungos toxigênicos em produtos alimentícios não significa a presença de micotoxinas, mas torna-se condição efetiva para produção desses produtos naturais. Por outro lado, a ausência dessas espécies não implica na ausência das micotoxinas, pois esses compostos permanecem ativos no substrato após a eliminação do microrganismo (PITT, 1985; HUSSEIN; BRASEL, 2001; FERREIRA et al., 2006).

Com relação as micotoxinas, estas podem ser divididas em três grandes grupos: (1) aflatoxinas, produzidas por certas espécies de *Aspergillus*; (2) fusariotoxinas, produzidas por *Fusarium*, representadas por zearalenona, tricotecenos e fumonisinas; (3) ocratoxinas, produzidas por *A. ochraceus* e *Penicillium verrucosum* (SAMSON et al., 1995; SCUSSEL, 2000).

Já foram descritos mais de 300 tipos de micotoxinas, mas somente 20 delas são freqüentemente quantificadas em gêneros alimentícios. Entre essas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, alcalóides do ergot, fumonisinas e aflatoxinas são as de maior nocividade, inclusive consideradas como riscos à saúde humana e a dos demais animais (Quadro 1) (HUSSEIN; BRASEL, 2001; BENNETT; KLICH, 2003; FERREIRA et al., 2006).

Os efeitos nocivos das micotoxinas são relacionados ao tipo, quantidade e freqüência de ingestão da micotoxina e também a idade, saúde e sexo do indivíduo exposto, sendo a presença desses metabólitos secundários em alimentos correlacionada a várias patologias humanas (Quadro 2) (CALDAS et al., 2002; BENNETT; KLICH, 2003).

Na Índia, um surto de hepatite afetou 400 indivíduos, dos quais 100 morreram após consumo de milho contendo aflatoxina em quantidade maior que 15 mg/Kg. Estimou-se que o consumo desse metabólito por alguns indivíduos adultos afetados

foi estimado entre 2-6 mg/dia, inferindo-se valores entre 10 e 20 mg como a dose aguda letal para adultos (PITT, 2000).

MICOTOXINAS	EFEITOS BIOLÓGICOS*									
	CAR	DER	EST	HEM	HEP	IMU	MUT	NEF	NEU	TER
Aflatoxina	X	-	-	-	X	X	X	-	-	-
Ergotoxina	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
Esterigmatocistina	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
Fumofisina	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
Fumonisina	X	-	-	-	X	X	X	X	X	-
Lolitremos	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
Ocratoxina	X	-	-	-	-	X	-	X	-	X
Paxilina	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
Penitremos	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
Tricotecenos	-	X	-	X	-	-	-	-	X	-
Zearalenona	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 2 – Ação biológica adversa de diferentes micotoxinas encontradas em alimentos.

\*Legenda: CAR = carcinogênico; DER = dermatóxico; EST = estrogênico; HEM = hemorrágico; HEP = hepatotóxico; IMU = imunotóxico; MUT = mutagênico; NEF = nefrotóxico; NEU = neurotóxico; TER = teratogênico; (X) = presente; (-) = ausente

Fonte: STEYN, 1995; SCUSSEL, 2000.

### Micotoxinas em produtos agrícolas

Produtos agrícolas após a colheita, como grãos de cereais ou forragens são substratos comumente associados à presença de micotoxinas (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Atribui-se duas maneiras de contaminação de cereais por fungos micotoxigênicos: pelo parasitismo na planta ou pelo estado sapróbio do fungo micotoxigênico durante a armazenagem (HUWIG et al., 2001).

Estudo realizado no Egito verificou a presença de fungos toxigênicos e micotoxinas em insumos de rações para frangos de corte. Nessa pesquisa, a

farinha de milho, a torta de sementes de algodão, a farinha de peixe e o farelo de trigo apresentaram aflatoxinas e zearalenona (MAHMOUD, 1993).

Em outro trabalho na África do Sul, 417 produtos alimentícios foram analisados quanto à presença de micotoxinas. Desses produtos, 19% estavam contaminados por tricotecenos, 6% por aflatoxina e 3% por zearalenona. Entre os produtos analisados, 94% das amostras de milho apresentaram positividade para fumonisina B<sub>1</sub> (DUTTON; KINSEY, 1995).

Farias et al. (2000), nas análises realizadas em grãos de milho coletados na fase de pós-colheita, no Paraná, detectaram a presença de diversas espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas, inclusive algumas sintetizando simultaneamente os quatro principais tipos - B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

Finalmente, de acordo com Boudra; Morgavi (2005), a produção de toxinas por *A. fumigatus* em meios de cultura e em insumos de rações significam riscos à saúde dos animais que consomem rações contaminadas.

### **Características e importância das aflatoxinas para a saúde animal**

Aflatoxinas são micotoxinas produzidas por espécies de *Aspergillus* (*A. bombicis*, *A. flavus*, *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*, *A. nomius*, *A. ochraceoroseus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. pseudotamarii*, *A. toxicarius* e *A. zhaoqingensis*), *Emericella* (*E. astellata* e *E. venezuelensis*) e por *Petromyces* em produtos alimentícios conforme as condições ambientais, métodos de processamento, produção e armazenamento (HUSSEIN; BRASSEL, 2001; FRISVAD et al., 2005; FERREIRA et al., 2006; KLICH, 2007).

Por muito tempo, se considerou que somente *Aspergillus* produzisse esse metabólito. No entanto, espécies de *Penicillium* (*P. puberulum*, *P. citrinum*, *P.*

*variabile* e *P. frequentans*) detectadas em alimentos destinados ao consumo humano também foram consideradas produtoras de aflatoxinas (HODGES et al., 1964; MISLIVEC et al., 1968; SCUSSEL, 1998).

Quimicamente, aflatoxinas são compostos heterocíclicos caracterizadas por um agrupamento dihidrofurano ou tetrahydrofurano fundido a um anel de cumarina ou lactona, dentre os quais os tipos B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e M<sub>1</sub> são os mais importantes (HUSSEIN; BRASEL, 2001; BENNETT; KLICH, 2003; FERREIRA et al., 2006; SANTACROCE et al., 2008).

A denominação “B” e “G” é devido à fluorescência azul (*blue*) ou verde (*green*) observada após exposição da toxina à irradiação ultravioleta e relativa mobilidade durante análise cromatográfica (BENNETT; KLICH, 2003; MURPHY et al., 2006), enquanto os números subscritos “1” e “2” indicam, respectivamente, o menor e o maior peso molecular do composto (PITT, 2000).

Qualquer patologia relacionada ao consumo de aflatoxinas é denominada aflatoxicose, esta classificada como aguda e crônica, patologias que causam a morte e câncer, respectivamente. Tratando-se de aflatoxicose crônica, predispõe ainda a supressão imunológica e outras condições patológicas consideradas leves (BENNETT; KLICH, 2003).

Entre os metabólitos aflatoxigênicos, a aflatoxina B<sub>1</sub> é o principal tipo sintetizado pelas espécies toxigênicas e o mais tóxico devido aos efeitos agudo e crônico observados em animais. É apontado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como um carcinógeno Grupo 1, no qual estão incluídos os compostos comprovadamente carcinógenos ao homem. (PITT, 2000; HUSSEIN; BRASSEL, 2001; BENNETT; KLICH, 2003; FERREIRA et al., 2006; MURPHY et al., 2006).

Por sua vez, os tipos G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> apresentam respectivamente 50, 20 e 10% da magnitude de toxicidade observada para o tipo B<sub>1</sub> (HUSSEIN; BRASSEL, 2001).

Aflatoxinas "M" são metabólitos predominantes da hidroxilação da aflatoxinas tipo B secretados por mamíferos, inclusive o homem, após consumo de alimento contaminado. São considerados produtos da desintoxicação da toxina origem e apresenta potencial hepatotóxico agudo de grande importância para a saúde pública devido ao alto consumo de leite, principalmente por crianças (PITT, 2000; HUSSEIN; BRASSEL, 2001; BENNETT; KLICH, 2003; MURPHY et al., 2006).

Misturas das aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> e M<sub>1</sub> apresentam comprovada carcinogenicidade ao homem, sendo também incluídos no Grupo 1 da IARC, enquanto os tipos M<sub>1</sub> isolado e B<sub>2</sub> são incluídos no Grupo 2 (prováveis carcinógenos humanos) (MURPHY et al., 2006).

Efeitos imunotóxicos observados em numerosos estudos com animais experimentais submetidos a aflatoxicoses parecem observáveis em humanos expostos à aflatoxina B<sub>1</sub>, nos quais os linfócitos foram suprimidos ou afetados pela presença dessa micotoxina (MURPHY et al., 2006).

Em crianças africanas, tanto a resposta da imunoglobulina A após vacinação quanto o crescimento foram suprimidos. Análises sorológicas revelaram níveis de adutos de aflatoxina proporcionais à resposta observada. Esses adutos são uma lesão bioquímica primária caracterizada pelo complexo formado entre a toxina e um material biológico, capaz de reparar ou causar mutação no local afetado (FERREIRA et al., 2006; MURPHY et al., 2006).

A exposição as aflatoxinas pela dieta é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular primário, mesmo em quantidades muito baixas, como demonstrado em experimentos com peixes, aves,

roedores, carnívoros e primatas, particularmente em indivíduos expostos à hepatite B (BENNETT; KLICH, 2003; FERREIRA, 2006).

Embora o fígado seja o alvo primário, o desenvolvimento de tumores em outros órgãos, a exemplo de pâncreas e intestino, foram observados em animais alimentados com rações contendo aflatoxinas (FERREIRA et al., 2006).

Na revisão apresentada por Hussein; Brassel (2001) estão citados os resultados relativos à ação de diferentes níveis de contaminação por aflatoxinas (Quadro 3).

<b>ANIMAL AFETADO</b>	<b>MICOTOXINA INGERIDA</b>	<b>PROBLEMAS DETECTADOS</b>
Frangos de corte	Aflatoxinas (3,5 mg/Kg), dos tipos B <sub>1</sub> (79%), G <sub>1</sub> (16%), B <sub>2</sub> (4%) e G <sub>2</sub> (1%)	Redução do crescimento corporal, aumento do peso de fígado e rim.
Porcos	Aflatoxinas (0,02 mg/Kg)	nenhum
Porcos	Aflatoxinas (0,385 mg/Kg)	Redução do ganho diário de peso, aumento de peso do fígado.
Porcos	Aflatoxinas (0,75 mg/Kg)	Redução do ganho diário de peso, aumento de peso do fígado.
Porcos	Aflatoxinas (1,48 mg/Kg)	Redução do ganho diário de peso, diminuição da eficiência alimentar, lesão hepatocelular.
Pôneis	Aflatoxina B <sub>1</sub> (doses agudas letais)	Disfunção hepática, dano nos músculos esquelético e cardíaco.
Cavalos	Aflatoxina	Hemorragia subcutânea e entérica, hiperplasias renal e hepática, necroses renal, hepática, nefrítica e miocardial
Cães	Aflatoxina (0,5-1,0 mg/Kg)	Hiperplasia hepática, coagulação intravascular disseminada, hemorragia interna, morte em três dias após ingestão.
Gatos	Aflatoxina (0,3-0,6 mg/Kg)	Hiperplasia hepática, coagulação intravascular disseminada, hemorragia interna, morte em três dias após ingestão.

Quadro 3 – Efeito da ingestão de diferentes níveis de aflatoxinas por animais

Fonte: HUSSEIN; BRASSEL, 2001 (adaptação).

Experimentalmente, observou-se ação sinérgica entre aflatoxina B<sub>1</sub> e o vírus da hepatite B no desenvolvimento de hepatomas em patos expostos a ambos os fatores. Portanto, aflatoxinas e hepatite B (também pertinente ao Grupo 1 da IARC) são cocarcinógenos e, quando concomitantes, aumentam bastante a probabilidade de desenvolvimento da doença, tal como ocorre em alguns países da África, parte do sudeste da Ásia, China, Filipinas e Tailândia (PITT, 2000; BENNETT; KLICH, 2003; FERREIRA et al., 2006).

Em outro experimento, camundongos transgênicos contendo seqüências do vírus da hepatite B no genoma desenvolveram problemas hepáticos após ingestão de aflatoxina B<sub>1</sub> (FERREIRA et al., 2006).

Além disso, existem evidências que demonstram a associação das aflatoxinas ao desencadeamento de outras doenças, tais como Síndrome de Reye (edema cerebral e deterioração visceral) e o Kwashiorkor (desnutrição severa). (BENNETT; KLICH, 2003; FERREIRA et al., 2006).

### **Micotoxinas em ração para peixes**

A ração comercial é um elemento importante na moderna produção animal devido atender a exigência nutricional de determinada espécie. Quando esse produto é fabricado a partir da mistura de outros insumos (a exemplo de *premix* – elemento básico de qualquer ração, formado pela homogeneização de vitaminas, minerais, aminoácidos e aditivos) com produtos agrícolas e subprodutos de baixa qualidade, tornam os animais mais suscetíveis aos efeitos deletérios após ingestão de rações contaminadas por fungos e/ou micotoxinas (HASHIMOTO et al., 2003; ACCENSI et al., 2004; CRAVET; LECOEUR, 2006).

Segundo Lumlertdacha et al. (1995), o efeito de ração contendo diferentes teores de toxinas produzidas por *Fusarium moniliforme* foi observado em bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) quando constataram uma relação proporcional direta entre o teor de toxinas e os efeitos negativos observados no crescimento, nos caracteres hematológicos e histopatológicos.

Outro destaque sobre a ação de micotoxinas está descrito por Carlson et al. (2001), que cita o efeito carcinogênico da fumonisina B<sub>1</sub> administrada para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em associação com aflatoxina B<sub>1</sub> e n-metil-n'-nitro-nitrosoguanidina. Em outros estudos comprovam que concentrações iguais ou maiores que 20 mg/Kg dessa micotoxina são tóxicas para os estágios de vida juvenil e adulto do bagre de canal (*I. punctatus*) (LUMLERTDACHA et al., 1995).

No Brasil, Hashimoto et al. (2003) citam a presença de fumonisinas em rações para peixes utilizadas no Paraná, com valores médios de 2,69 µg/g em rações extrusadas e 1,60 µg/g em rações peletizadas. Outros dados desses autores são as análises quantitativas de aflatoxinas totais por cromatografia em camada delgada, com valores médios de 3,32 ng/g em rações extrusadas e de 1,40 ng/g em rações peletizadas.

O crescimento de tilápias alimentadas com rações peletizadas elaboradas com farinha de palmito contaminada por *Aspergillus flavus* ficou comprometido, sendo este fato atribuído ao decréscimo da digestibilidade e presença de fatores antinutricionais no alimento fornecido (LIM et al., 2001).

Experimento realizado em rohu (*Labeo rohita*), a principal carpa cultivada na Índia constata efeitos imunossupressores induzidos pela injeção intraperitoneal de aflatoxina B<sub>1</sub> (SAHOO; MUKHERJEE, 2001). Efeitos negativos no crescimento e lesões hepáticas foram atestados em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após



ingestão dessa micotoxina em concentrações maiores que 0,25 mg/Kg de ração (TUAN et al., 2002).

### **Processamentos de alimentos *versus* micotoxinas**

Micotoxinas em geral são compostos estáveis, não afetados pela maioria das operações de processamento de alimentos e, quando presentes em ingredientes de qualquer alimento, alcançam o produto final e seus respectivos consumidores. No entanto, algumas estratégias de natureza física, química ou biológica afetam a contaminação de alimentos por micotoxinas (HUSSEIN; BRASSEL, 2001; HUWIG et al, 2001).

Entre as estratégias físicas citadas por Huwig et al. (2001), a utilização de adsorventes, como carvão ativado, aluminossilicatos e polímeros são aplicadas em alimentação animal, apresentando diferentes propriedades:

1) O carvão ativado é um adsorvente formado pela pirólise de materiais orgânicos, muito poroso e insolúvel que pode ser usado como antídoto contra envenenamentos e na inativação de micotoxinas em meio aquoso. Contudo, diferentes carvões ativados tem pouco ou nenhum efeito em micotoxicoses.

2) Entre os aluminossilicatos – montmorilonita, zeólitos, aluminossilicatos de cálcio e sódio hidratado, argilas, bentonita, diatomáceas – o mais eficiente foi a montmorilonita quimicamente modificada pela adição de longas cadeias de amônio quaternário, capaz de adsorver a zearalenona em  $108 \text{ mg.g}^{-1}$ , micotoxina.adsorvente<sup>-1</sup>.

3) A colesterolamina e as paredes celulares de fungos unicelulares, apesar da boa reatividade *in vitro* com micotoxinas, apresentaram desempenho bastante diminuído nos testes *in vivo*.

Os processos de seleção dos alimentos minimizam a concentração de micotoxinas no produto final por remover o material visivelmente deteriorado por fungos do material aparentemente intacto. A concentração de fumonisinas em milho foi reduzida em 26-69%; de deoxinivalenol em trigo, 5,5-19%; de ocratoxina A em cevada, 2-3%; de aflatoxinas em vários grãos, 40-80% (BULLERMAN, BIANCHINI, 2007).

A moagem seca redistribui ou concentra as micotoxinas no gérmen e farelo do grão, seja milho, trigo ou cevada. De forma similar, a moagem úmida redistribuiu as micotoxinas entre os subprodutos. Fumonisinas presente em milho submetido à moagem úmida foram detectadas na fase aquosa, glúten, fibra e frações do germe, enquanto que o amido apresentou níveis não-detectáveis da toxina ao final do processo. Os subprodutos da moagem geralmente são direcionados para alimentação animal (BRERA et al., 2006; SCUDAMORE, 2005; BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

Nas citações de Bullerman; Bianchini (2007), consta que a cervejaria acaba transmitindo as micotoxinas presentes em grãos maltados ou adjuntos para o produto final. Entretanto, pode ser verificada alguma redução na etapas de mosturação (15%), cocção do mosto (10%) e fermentação (10%) como efeito da separação de partículas sólidas no meio aquoso durante os processos de decantação e filtrações.

Nesse trabalho, constam também que no preparo de produtos de panificação, arroz cozido e outros alimentos com micotoxinas apresentaram diferentes níveis de redução desses metabólitos durante o processamento dos ingredientes. Contudo, esse autor conclui que, dependendo do modo de fabricação do alimento, pode ocorrer diluição e redistribuição de micotoxinas. Além disso, o autor acrescenta que

a alta temperatura causa redução de micotoxinas, apesar da maioria desses biocompostos serem moderadamente estáveis em certos sistemas de processamento de alimentos.

Quimicamente, aflatoxinas quando tratadas com hidróxido de amônio ou amônia gasosa foi observada redução dessa micotoxina, constatando-se compostos perigosos para saúde animal. Em outros experimentos, o ácido hidrolórico, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, ácido ascórbico e carbonato de amônia não demonstraram qualquer eficiência contra o deoxinivalenol (HUWIG et al., 2001; JOUANY, 2007).

O ozônio concentrado foi utilizado na degradação *in vitro* de várias micotoxinas, tanto que as aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>1</sub> foram rapidamente degradadas (15 segundos) utilizando-se 2% de ozônio, enquanto as aflatoxinas B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> necessitaram de 20% desse elemento para apresentarem o mesmo resultado. As demais micotoxinas (patulina, ácido ciclopiazônico, ocratoxina A, ácido selacônico) não demonstraram toxicidade após 15 segundos de exposição ao ozônio. No entanto, a fumonisina B<sub>1</sub> e zearalenona apresentaram subprodutos cuja desintoxicação não foi demonstrada (JOUANY, 2007).

Em relação à influência da irradiação sobre micotoxinas, há vários estudos com resultados conflitantes, tanto que Aziz et al. (2006) citam que ocratoxina A exposta a 75 kGy (quilogray) e 15-20 kGy expressou, respectivamente, estabilidade e completa eliminação dessa micotoxina. Em outros trabalhos com aflatoxina, enquanto Aziz, Youssef (2002) afirmam que 20 kGy é suficiente para total eliminação dessa micotoxina, Aziz et al. (2004) verificaram que isso somente é possível em doses superiores a 50 kGy.

As estratégias biológicas ainda não são amplamente utilizadas devido ao crescente registro de patentes. Essas estratégias incluem procedimentos de fermentação utilizando microrganismos, a exemplo de *Flavobacterium auranticum* e *Trichosporon mycotoxinivorans*. *F. auranticum* foi capaz de converter a aflatoxina B<sub>1</sub> em produtos menos tóxicos “mesmo de forma lenta e incompleta” (HUWIG et al., 2001). *T. mycotoxinivorans* degradou completamente a ocratoxina A e zearalenona sem deixar resíduos tóxicos conforme atestado em experimentos com frangos (MOLNAR et al., 2004).

### **Efeito da extrusão nas micotoxinas**

A fabricação de rações por extrusão consiste num processo de cozimento dos insumos em alta temperatura (130–150 °C), pressão (30–60 atm) e umidade controlada, em curto espaço de tempo, favorecendo a estabilidade da ração na superfície da água e facilitando o manejo alimentar na piscicultura (KUBITZA, 1999; AMARAL, 2002).

O processo extrusivo leva à desnaturação parcial de proteínas, diminuição da perda de vitaminas, inibição de fatores antinutricionais, retardo na rancificação, aumento da digestibilidade das gorduras e modificação do amido com mais eficiência, contribuindo na expansão e coesão do produto final (KUBITZA, 1999; AMARAL, 2002).

Quando submetida ao processo de extrusão a 150 °C e 180 °C, a farinha de milho previamente contaminada com deoxinivalenol e aflatoxinas apresentou reduções nesses compostos [deoxinivalenol-99,5%(máximo) e aflatoxina B<sub>1</sub>-25% (máximo)], principalmente a 180 °C (CAZZANIGA et al., 2001).

Em outras análises, quando foi feita a comparação da eficiência do processo de extrusão relativa a redução de aflatoxina durante o processamento de sementes de algodão a 104 °C, 132 °C e 160 °C, foi comprovado que decréscimo do teor de aflatoxina estava associado ao número de estágios de processamento extrusivo, tanto que, ao utilizarem três estágios de processamento a 104 °C, dois estágios a 132 °C e um estágio a 160 °C, a redução correspondeu a 55 %, 50% e 76%, respectivamente (BUSER; ABBAS, 2002).

### **Legislação brasileira relacionada a micotoxinas em alimento**

O Ministério da Agricultura e Reforma Agrária aprova os métodos analíticos para controle de alimentos para uso animal, inclusive micotoxinas (BRASIL, 1991). O Ministério da Saúde (BRASIL, 2002) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996) estabelecem o limite de 20  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de aflatoxinas total para amendoim e milho. Porém, para comercialização de outros produtos, subprodutos e derivados de origem vegetal não têm fixado os teores mínimos de aflatoxina.

A legislação brasileira ignora o efeito tóxico das diversas micotoxinas quando estabelece níveis máximos somente para aflatoxinas. A ocorrência simultânea de várias micotoxinas em produtos à base de vegetais e os efeitos observados podem ser de natureza sinérgica, aditiva ou antagonista, dependendo do órgão, animal ou finalidade do estudo (SPEIJERS; SPEIJERS, 2004).

Hashimoto et al. (2003) detectaram a co-ocorrência de aflatoxina e fumonisina em rações para peixe e sugeriram o risco de sinergismo tóxico ao qual o peixe cultivado com esse produto estava submetido.

## **Procedimentos analíticos para detecção de micotoxinas em alimentos**

Desde a descoberta das micotoxinas, diversos procedimentos têm sido desenvolvidos para detecção desses biocompostos em produtos alimentares. Na maioria deles, as principais medidas envolvem extração, purificação do extrato e limpeza, separação dos componentes do extrato, quantificação e confirmação (SCUSSEL, 1998; 2000).

Apesar dos procedimentos de purificação e limpeza, os processo de separação e detecção são apenas presuntivos, pois outros metabólitos não tóxicos podem apresentar comportamentos similares ao das micotoxinas (SANTOS et al., 1998).

Para detecção e quantificação de micotoxinas em alimentos, vários métodos são utilizados, destacando-se os métodos cromatográficos (cromatografia em camada delgada – CCD, cromatografia líquida de alta resolução – CLAE, cromatografia em camada delgada de alta eficiência – CCDAE e cromatografia gasosa – CG), fotométricos (fotofluorimetria – FTM) e os métodos de imunoenaios (ELISA e radioimunoensaio) (SANTOS et al., 1998; SCUSSEL, 1998; 2000; KRŠKA et al., 2008).

As micotoxinas, como a aflatoxina, adsorvem luz UV e emitem essa energia sob a forma de luz fluorescente. Esta característica comum a outras micotoxinas permite a detecção e identificação quando são utilizados métodos confiáveis, pois esses dependem das propriedades físico-químicas desses metabólitos (Quadro 3).

Os métodos quantitativos para micotoxinas podem usar combinações das técnicas anteriormente citadas. Para a maioria desses biocompostos é utilizada uma limpeza por imunoafinidade com separação por CLAE, finalizada com detecção por fluorescência ou exposição a luz ultravioleta (KRŠKA et al., 2008).

O imunoensaio ELISA (*enzyme linked immuno-sorbent assay*) para micotoxinas, apesar de ainda não suficientemente validado, é do tipo competitivo direto, quantitativo, atua na fase cinética da ligação anticorpo-antígeno e apresenta o tempo de análise reduzido para aproximadamente 25 minutos. Apresenta alguns inconvenientes, como o efeito matriz (quando outros compostos não-micotoxinas se ligam aos anticorpos do ensaio), propiciando uma sub ou superestimação da quantidade de micotoxina presente no alimento (ZHENG et al., 2006).

Outros imunoenaios baseados em membranas, de caráter semi-quantitativo, não requerem nenhum equipamento adicional ao kit comercial e podem ser efetuados no campo em até 5 minutos. O método *flow-through assay* apresenta como inconveniente a dificuldade para interpretação dos resultados quando a quantidade de micotoxina no alimento é próxima ao limite inferior de detecção do método. O método *lateral flow test* é um teste imunocromatográfico, mais estável a uma maior variedade de climas e apresenta limite de detecção bastante inferior quando comparado ao anteriormente citado. Por serem semi-quantitativos, necessitam de um teste de referência, como CLAE, para a confirmação da quantidade de micotoxina aferida (ZHENG et al., 2006).

A fotofluorimetria é um método quantitativo, que necessita dos procedimentos de extração e limpeza da amostra antes da leitura no equipamento adequado (fluorômetro), sendo executado em até 15 minutos (ZHENG et al., 2006).

A polarização fluorescente, outro método quantitativo, é um imunoensaio baseado na competição entre a micotoxina e o traçador micotoxina-fluoresceína por um anticorpo específico para a micotoxina. Este método não envolve uma reação enzimática ou necessita de qualquer procedimentos de limpeza da amostra e pode ser efetuado em até 5 minutos. Entretanto, como o ELISA, pode apresentar efeito

matriz e necessita de validação para aplicação em diversos substratos (ZHENG et al., 2006).

Outros métodos são propostos, a exemplo dos biosensores e dos métodos multimicotoxinas, cuja finalidade é a detecção de diferentes micotoxinas a partir de um único tratamento ao qual determinada amostra é submetida.

Van der Gaag et al. (2003) descreveram os procedimentos para quantificação simultânea de quatro micotoxinas através de um equipamento biosensor imunoquímico, comparando o resultado obtido com o procedimento de CLAE/CG. Neste trabalho, a sensibilidade do método foi bastante relevante, quantificando valores bastante inferiores aos limites estabelecidos pela legislação xxx, apesar da necessidade do procedimento de limpeza da amostra.

Atualmente, altamente sofisticados, os métodos multimicotoxinas baseados em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em múltiplos estágios permitem acurácia e precisão sem a necessidade do procedimento de limpeza (KRSKA et al., 2008).

A CLAE é um método muito sensível, entretanto bastante caro e consome mais tempo devido a necessidade dos demorados procedimentos de extração e limpeza (VAN DER GAAG et al., 2003).

Para identificação de biocompostos fúngicos pela CDD, a alternativa mais barata e utilizada, aplica-se manchas paralelas de uma substância pura (a exemplo de griseofulvina ou padrões de aflatoxinas) e outra substância desconhecida (extrato orgânico ou *imprint* utilizando plug de ágar obtido a partir de cultura fúngica pura). Ao final do tempo de eluição, procede-se a revelação da placa cromatográfica (Quadro 4) seguida do cálculo dos *R<sub>f</sub>*s obtidos pelas manchas reveladas (SAMSON et al., 1995; RAZAK et al., 1999; SAITO; MACHIDA, 1999).



TOXINA	COR VISUALIZADA	
	LUZ VISÍVEL	LUZ ULTRAVIOLETA ( 365 nm)
Aflatoxinas B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub>	-	azul
Aflatoxinas G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub>	-	verde
Aflatoxinas M <sub>1</sub> e M <sub>2</sub>	-	azul
Ácido penicílico	amarelo*	amarelo brilhante**
Citrinina	-	amarelo
Esterigmatocistina	-	vermelho acastanhado
Ocratoxina A	-	azul esverdeado/azul brilhante
Patulina	amarelo*	azul clara
Toxina T-2	rosa cinzento***	-
Zearalenona	-	azul clara
Rubratoxina B	-	escura

Quadro 4 - Cores emitidas por micotoxinas em diferentes comprimentos de onda

Legenda: Reagente usado para revelação - \* fenilhidrazina a quente; \*\* vapor de amoníaco; \*\*\* p-anisaldeído

Fonte: SANTOS et al., 1998

*Rf* (*Ratio to the Front*) ou Fator de Retenção é a razão entre a distância percorrida por um componente (biocomposto) e a distância percorrida pelo solvente, conforme demonstrado na fórmula a seguir (DIAS et al., 2004):

$$Rf = \frac{\text{Distância de migração do biocomposto (cm)}}{\text{Distância de migração da frente do solvente (cm)}}$$

### **Bioensaios de toxicidade utilizando *Artemia***

Bioensaios de toxicidade são úteis para avaliar a exposição de uma grande variedade de extratos (microbiano, animal, vegetal ou mineral) no crescimento ou sobrevivência de um determinado organismo – coelhos, ratos, camundongos, entre outros (RICE; MANESS, 2004).

Diante disso, a utilização de espécies de *Artemia* (exemplo: *A. salina* e *A. franciscana*) como modelo experimental alternativo vem se popularizando no meio científico devido ao baixo custo para implantação e manutenção das culturas, além

de uma importante correlação ( $r=0,85 - p<0.05$ ) demonstrada quando se comparou o resultado de bioensaios utilizando esse microcrustáceo e camundongos (PARRA et al., 2001).

Entre as espécies de *Artemia*, *A. salina* é um microcrustáceo filtrador, com variadas formas de reprodução, dimorfismo sexual, capaz de produzir ovos com casca fina ou casca grossa (cistos) em condições ambientais favoráveis ou desfavoráveis, respectivamente (NUNES et al. 2006).

Em condições favoráveis, cistos de *A. salina* são eclodidos e as larvas podem ser usadas em testes toxicológicos *in vitro*, quando se verifica uma boa relação entre a letalidade alcançada no teste e a detecção de compostos tóxicos (CARBALLO et al., 2002; RICE; MANESS, 2004; FAVILLA et al., 2006).

A *A. salina* é tida como organismo-teste bastante sensível para a detecção de metabólitos tóxicos de fungos, a exemplo de esterigmatocistina e aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> (HARWIG; SCOTT, 1971; GONZÁLEZ et al., 2007).

Testes realizados com *Penicillium* e *Aspergillus* isolados de amostras de solo, água e mariscos provenientes de áreas de maricultura mostraram uma grande proporção (respectivamente, 51,6 e 40,0%) de extratos brutos com atividade tóxica. Nesse trabalho os extratos analisados foram obtidos por cultivo de fungos em meio líquido e submetidas ao teste de toxicidade contra larvas de *A. salina*. Portanto, essas análises comprovam o potencial de produção das toxinas por fungos em áreas de aqüicultura e também os impactos negativos ao meio ambiente, à produção e à saúde pública (SALLENAVE-NAMONT et al., 2000).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A atividade biológica dos fungos filamentosos nos diversos ecossistemas proporciona a produção de compostos de importância médica, ambiental e alimentícia. Contudo, em condições restritas e seletivas, certas espécies desses microrganismos produzem e excretam para o substrato diversos metabólitos secundários, entre os quais as micotoxinas, que se destacam pelo impacto negativo na saúde animal e humana. Dentre as micotoxinas, a associação de técnicas específicas para análise de aflatoxinas proporcionam à detecção dessas micotoxinas em outras espécies de fungos anamorfos, além de linhagens de *A. flavus* e *A. parasiticus*. Fungos filamentosos e as micotoxinas quando presentes em produtos alimentícios comprometem a qualidade nutricional e causam perdas econômicas, condição que exige o desenvolvimento de legislação nacional de maior amplitude, de forma a incluir outras toxinas fúngicas. Na região amazônica, devido o grande consumo *per capita* e o crescente aumento do mercado de peixes cultivados, há necessidade de estudos para verificação da qualidade do alimento fornecido a esses animais, visando à obtenção de produtos e subprodutos de qualidade, de forma a garantir a saúde do consumidor.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

## **REFERÊNCIAS:**

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*, n.21, p.623-27, 2004.

AINSWORTH, G.C.; SUSSMAN, A.S. *The Fungi: an advanced treatise*. v.1-The Fungi cell, 1.ed. New York: Academic Press, 1965.

AMARAL, Cecília Maria Costa do. Extrusão e peletização de ração completa: efeitos no desempenho, na digestibilidade e no desenvolvimento das câmaras gástricas de cabritos saanen. p.1-2. Jaboticabal: UNESP, 2002. *Dissertação* (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2002.

ATANDA, O. O.; AKPAN, I.; ENIKUOMEHIN, O. A. Palm kernel agar: An alternative culture medium for rapid detection of aflatoxins in agricultural commodities. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 10, p. 1029-33, 2006.

ATAYDE, Hérlon Mota; SILVA, Antônio José Inhamuns da; TEIXEIRA, Maria Francisca Simas. Micobiota presente em pescado processado comercializado na cidade de Manaus, Amazonas. *Revista Higiene Alimentar*, v. 19, n.134, p. 89-93, 2005.

AZIZ, Nagy H.; MATTAR, Zakaria Ahmed; MAHROUS, Souzan Rousdy. Contamination of grains by mycotoxin-producing molds and mycotoxins and control by gamma irradiation. *Journal of Food Safety*, v. 26, p.184-201, 2006.

AZIZ, Nagy H.; MOUSSA, Loutfy A. A.; FAR, Ferial M.E. Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-radiation. *Journal of Food Safety*, v.24, p.109-127, 2004.

AZIZ, Nagy H.; YOUSSEF, B.M. Inactivation of naturally occurring of mycotoxins in some Egyptian foods and agricultural commodities by gamma-irradiation. *Egyptian Journal of Food Science*, v.30, p.167-177, 2002.

BAPTISTA, Antonio Sampaio; HORII, Jorge; BAPTISTA, Aparecido Sampaio. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. *Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos*, n.1, p.1-14, 2004.

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

BINDER, Eva M. Managing the risk of mycotoxin in modern feed production. *Animal Feed Science Technology*, v. 133, p. 149-166, 2007.

BOUDRA, H.; MORGAVI, D.P. Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. *Animal Feed Science and Technology*, v. 120, p. 113-123, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Portaria nº 108, de 04 de setembro de 1991. Aprova os métodos analíticos para controle de alimentos para uso animal. In: *Diário Oficial da União*, Brasília, 17/09/1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 183, de 21 de março de 1996. Adota regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela Resolução nº 56/94, de 12 de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul. In: *Diário Oficial da União*, Brasília, s.1, 25/03/1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Resolução-RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002*. Aprova os regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. 2002.

BRERA, Carlo; CATANO, Carla; DE SANTIS, Barbara; DEBEGNACH, Francesca; DE GIACOMO, Marzia de; PANNUNZI, Elena; MIRAGLIA, Marina. Effect of industrial processing on the distribution of aflatoxins and zearalenone in corn-milling fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n. 54, v. 14, p. 5014 -5019, 2006.

BULLERMAN, Lloyd B.; BIANCHINI, Andreia. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, v. 119, n.1-2; p. 140-146, 2007.

BUSER, Michael D.; ABBAS, Hamed K. Effects of extrusion temperature and dwell time on aflatoxin levels in cottonseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.9, p. 2556-59, 2002.

CALDAS, Eloisa Dutra; SILVA, Saulo Cardoso; OLIVEIRA, João Nascimento. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e risco para a saúde humana, *Revista de Saúde Pública*, n. 36, ed. 3, p. 319-23, 2002.

CARBALLO, José Luis; HERNÁNDEZ-INDA, Zaira; PÉREZ, Pilar; GARCÍA-GRÁVALOS, María D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BioMed Central Biotechnology*, v. 2, p. 17-21, 2002.

CARLSON, David B.; WILLIAMS, David E.; SPITSBERGEN, Jan M.; ROSS, P. Frank; BACON, Charles W.; MEREDITH, Filmore I.; RILEY, Ronald T. Fumonisin B<sub>1</sub> promotes aflatoxin B<sub>1</sub> and n-methyl-n'-nitro-nitrosoguanidina-initiated liver tumors in rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 172, p. 29-36, 2001.

CAZZANIGA, D.; BASILICO, J.C.; GONZÁLEZ, R.J.; TORRES, R.L.; DE GREEF, D.M. Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. *Letters in Applied Microbiology*, v. 33, n. 2, p. 144-47, 2001.

CRAVET, S.; LECOEUR, S. Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology*, Massachusetts, n.44, p. 444-453, 2006.

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

DEACON, Jim W., *Modern mycology*. 3.ed. U.S.A.: Blackwell Science, 1997.

DIAS, Ayres Guimarães; COSTA, Marco Antonio da; GUIMARÃES, Pedro Ivo Canesso. *Guia Prático de Química Orgânica*, v.1. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2004.

DUTTON, Michael F.; KINSEY, Ann. Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa 1994. *Mycopathologia*, New York, v. 1, n. 131, p. 31-36, 1995.

FARIAS, Antonio Xavier de; ROBBS, Charles Frederick; BITTENCOURT, Anna Maria; ANDERSEN, Paul Marius; CORRÊA, Tânia Barretto Simões. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Goiânia, v. 35, n. 3, p. 620, 2000.

FAVILLA, M.; MACCHIA, L.; GALLO, A.; ALTOMARE, C. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food and Chemical Toxicology*, Massachusetts, v. 44, p. 1922-31, 2006.

FERREIRA, Helder; PITTNER, Elaine; SANCHES, Hermes Francisco; MONTEIRO, Marta Chagas. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. *Ambiência*, Guarapava, n.1, v.2, p. 113-27, 2006.

FRISVAD, Jens C.; SKOUBOE, Pernille; SAMSON, Robert A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B<sub>1</sub>, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, Freising, v.28, p. 442-453, 2005.

GONZÁLEZ, Ana María; PRESA, Maximiliano; LATORRE, María Gabriela; LURÁ, María Cristina. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao, v. 24, p. 59-61, 2007.

GRIFFIN, David H. *Fungal physiology*. 2.ed. U.S.A.: Wiley-Liss, Inc., 1993.

HARWIG, J.; SCOTT, P.M. Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Applied Microbiology*, Northern Ireland, v. 21, n. 6, p. 1011-06, 1971.

HASHIMOTO, Elisabete Hiromi; SANTOS, Maria Ângela do; ONO, Elisabete Yurie Sataque; HAYASHI, Cármino; BRACARENSE, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro; HIROOKA, Elisa Yoko. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 14, n. 1, p. 123-32, 2003.

HODGES, F. Allen; ZUST, James R.; SMITH, Howard R.; NELSON, A. A.; ARMBRETT, B. H.; CAMPBELL, A. D. Mycotoxins: aflatoxin isolated from *Penicillium puberulum*. *Science*, v. 145, n. 3639, p. 1439, 1964.

HUSSEIN, Hussein S.; BRASEL, Jeffrey M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, Hamburg, n. 167, p. 101-34, 2001.

HUWIG, Alexander; FREIMUND, Stefan; KÄPPELI, Othmar; DUTLER, Hans. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, Würzburg, Alemanha, n. 122, p. 179-88, 2001.

JOUANY, Jean Pierre. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, n. 137, p. 342-362, 2007.

KLICH, Maren A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, v. 48, p. 71–80, 2007.

KRSKA, Rudolf; SCHUBERT-ULLRICH, Patrícia; MOLINELLI, Alexandra; SULLYOK, Michael; MACDONALD, Susan; CREWS, Colins. Mycotoxins analysis: An update. *Food Additives And Contaminants: Part A*, v. 25, n. 2, p. 152-63, 2008.

KUBITZA, Fernando. *Nutrição e alimentação dos peixes cultivados*. 3.ed., Jundiaí: Fernando Kubitza, 1999.

LEUNG, Maxwell C. K.; DÍAZ-LLANO, Gabriel; SMITH, Trevor K. Mycotoxins in pet foods: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 26, p. 9623-35, 2006.

LIM, H.A.; NG, W.K.; LIM, S.L.; IBRAHIM, C.O. Contamination of palm kernel meal with *Aspergillus flavus* affects its nutritive value in pelleted feed for tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture Research*, v. 32, p. 895-905, 2001.

LUMLERTDACHA, Sonkphan; LOVELL, Richard T.; SHELBY, Richard A.; LENZ, Stephen D.; KEMPPAINEN, Barbara W. Growth, hematology and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. *Aquaculture*, v. 130, p. 201-218, 1995.

MAHMOUD, A.L.E. Toxigenic fungi and mycotoxin content in poultry feedstuff ingredients. *Journal of Basic Microbiology*, v. 33, n. 2, p. 101-04, 1993.

MARTÍN, Juan F.; CASQUEIRO, Javier; LIRAS, Paloma. Secretion systems of secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. *Current Opinion in Microbiology*, n. 8, p. 282, 2005.

MISLIVEC, Philip B.; HUNTER, J. H.; TUIE, John. Assay for aflatoxin production by the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Applied Microbiology*, Northern Ireland, v. 16, n. 7, p.1053-55, 1968.

MOLNAR, Orsolya; SCHATZMAYR, Gerd; FUCHS, Elisabeth; PRILLINGER, Hansjoerg. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology*, n. 27, p. 661-671, 2004.

MURPHY, Patrícia A.; HENDRICH, Suzanne; LANDGREN, Cindy; BRYANT, Cory. Food mycotoxins: an update. *Journal of Food Science*, v.71, n.5, 2006.

NUNES, Bruno S.; CARVALHO, Félix D.; GUILHERMINO, Lúcia M.; STAPPEN, Gilbert Van. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, n. 144, p. 453-62, 2006.

PARRA, A. Lagarto; YHEBRA, R. Silva; SARDIÑAS, I. Guerra; BUELA, L. Iglesias. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v. 8, n. 5, p. 395–400, 2001.

PEREIRA, Maria Marlúcia Gomes; CARVALHO, Eliana Pinheiro de; PRADO, Guilherme. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. *Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos*, v.20, p.141-56, 2002.

PITT, J.I. *A laboratory guide to Common Penicillium species*. Áustria: CSIRO. Division of Food Research, 1985.

\_\_\_\_\_. Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, v. 38, n.1, p.17-22, 2000.

RAZAK, A. A.; BACHMANN, G; ALI, Th. M.; FARRAG, R. Activities of microflora in soils of upper and lower Egypt. *The African Journal of Mycology and Biotechnology*, Austrália, v. 7, n. 1, p. 1-19, 1999.

RICE, Stanley A.; MANESS, Ian B. Brine Shrimp Bioassays: a useful technique in biological investigations. *The American Biology Teacher*, v. 66, n. 3, p. 208-14, 2004.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Immunosuppressive effects of aflatoxin B<sub>1</sub> in Indian major carp (*Labeo rohita*). *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, n. 24, p. 143-149, 2001.

SAITO, M; MACHIDA, S. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience*, v. 40, p. 205-208. 1999.

SALLENAVE-NAMONT, C.; POUCHUS, Y.F.; ROBIU DU PONT, T.; LASSUS, P.; VERBIST, J.F. Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. *Mycophatologia*, n. 149, p. 21-5, 2000.

SAMSON, Robert A.; HOEKSTRA, Ellen S.; FRISVAD, Jens C.; FILTENBORG, Ole. *Introduction to food-borne fungi*, 4. ed., Netherlands:Centraalbureau voor's Schimmelcultures, 1995.

SANTACROCE, Maria Pia; CONVERSANO, M.C.; CASALINO, E., LAI, O.; ZIZZADORO, C.; CENTODUCATI, G.; CRESCENZO, G. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Review in Fish Biology and Fisheries*, v. 18, p. 99-130, 2008.

SANTOS, Isabel M.; VENÂNCIO, Armando; LIMA, Nelson. *Fungos contaminantes na indústria alimentar*, 1.ed., Braga: Micoteca da Universidade do Minho, 1998.

SCUDAMORE, Keith A. Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds, *Food Additives & Contaminants*, v. 22, n. 1, p. 17-25, 2005.

SCUSSEL, Vildes Maria. *Micotoxinas em alimentos*, 1.ed. Santa Catarina: Editora Insular Ltda., 1998.

\_\_\_\_\_. *Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos*. 1.ed. Santa Catarina: Editora Vildes Maria Scussel, 2000.



SILVA, Jorge Antonio Moreira da; PEREIRA-FILHO, Manoel; OLIVEIRA-PEREIRA, Maria Inês de. Frutos e sementes consumidos pelo tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) incorporados em rações. Digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, n. 6, p. 1815-24, 2003.

SILVEIRA, Verlande Duarte. *Micologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., 1995.

SPEIJERS, G.I.A.; SPEIJERS, M.H.M. Combined toxic effects fo mycotoxins. *Toxicology Letters*, Würzburg, Alemanha, n.153, p. 91-8, 2004.

STEYN, Pieter S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters*, Würzburg, Alemanha, n.82/83, p. 843-44, 1995.

TEIXEIRA, Maria Francisca Simas; MATSUURA, Ani Beatriz Jackisch; SOARES, Carla Silvana da Silva Santos. *Micologia médica: manual de laboratório*. 1. ed. Manaus: Editora da Universidade do Amazonas, 1999.

TUAN, Nguyen A.; GRIZZLE, John M.; LOVELL, Richard T.; MANNING, Bruce B.; ROTTINGHAUS, George E. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B<sub>1</sub>. *Aquaculture*, v. 212, p. 311-19, 2002.

VAN DER GAAG, Bram; SPATH, Sabine; DIETRICH, Heidi; STIGTER, Edwin; BOONZAAIJER, Gerben; VAN OSENBRUGGEN, Ton; KOOPAL, Kees. Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control*, n.14, p. 251-254, 2003.

YIANNIKOURIS, Alexandros; JOUANY, Jean-Pierre. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, n. 51, p. 81-99, 2002.

ZHENG, Michael Z.; RICHARD, John L.; BINDER, Johann. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, New York, n.161, p.261-273, 2006.

## QUANTIFICAÇÃO DE MICROFUNGOS DA RAÇÃO COMERCIAL PARA PISCICULTURA TROPICAL E EFEITO TÓXICO DOS EXTRATOS EM *Artemia*

Hérilon Mota ATAYDE<sup>1</sup>, Maria Ivanilde ARAÚJO<sup>2</sup>, Maria Francisca Simas TEIXEIRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Engenheiro de Pesca – Mestre em Ciência de Alimentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas(FCF) – Universidade Federal do Amazonas(UFAM). e-mail: herlonatayde@bol.com.br.

<sup>2</sup> Estatística – Doutora em Engenharia de Produção – Departamento de Estatística – Instituto de Ciências Exatas(ICE) – UFAM. e-mail: miaraujo@ufam.edu.br.

<sup>3</sup> Bióloga – Doutora em Biotecnologia – Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas(ICB) – UFAM. e-mail: mteixeira@ufam.edu.br.

### RESUMO:

Nesse estudo, amostras de ração extrusada para peixes, produzidas no Amazonas-Brasil (fábricas F1 e F2; n=15, cada) tiveram a microbiota quantificada e identificada. Alguns isolados (n=29) foram caracterizados quanto à toxicidade contra *Artemia salina*; adicionalmente, pH e umidade intrínsecos foram comparados às condições favoráveis ao desenvolvimento fúngico. Para isolamento e quantificação, diluições decimais (até  $10^{-3}$ ) foram inoculadas na superfície de ágar rosa bengala cloranfenicol, em triplicata, incubados a 25 °C/7 dias, diariamente monitorados. Obtiveram-se índices de UFC/g (F1=1,45x10<sup>2</sup>; F2=3,77x10) abaixo do limite estabelecido para alimentação animal (10<sup>5</sup> UFC/g). Umidade (F1=8,82%; F2=8,21%) e pH (F1=6,64; F2=6,66) foram adequados ao crescimento de fungos, especialmente xerófilos. Foram isoladas 881 colônias (F1=85,5%, F2=14,5%) e identificadas 15 espécies, com maior prevalência de *Penicillium implicatum*(F1=22,5%; F2=4,0%), *Penicillium janczewskii*(F1=22,4%; F2=4,1%) e *Penicillium melinii*(F1=21,9%; F2=4,0%). Extratos aquosos brutos foram submetidos a duas formas de bioensaio de toxicidade – com disco de papel de filtro(CDPF) e sem disco de papel de filtro(SDPF) – que confirmaram a sensibilidade da *Artemia* aos mico-metabólitos. Verificaram-se resultados diferenciados em alguns isolados de *Absidia cylindrospora* e *P. janczewskii* (tóxicos quando CDPF; altamente tóxicos quando SDPF). Apesar disso, estatisticamente, bioensaios utilizando extratos aquosos não são influenciados pelo uso do disco de papel de filtro. Apenas *A. cylindrospora* e *Penicillium paxillii* não demonstraram toxicidade. Apesar da boa qualidade das rações extrusadas, a ocorrência desses microrganismos é preocupante devido a grave bioatividade dos extrólitos produzidos pelos isolados e relativa estabilidade de mico-metabólitos ao processamento de alimentos, significando riscos à produtividade, saúde animal e consumidores de peixes cultivados.

Termos para indexação: fungos, micotoxinas, ração, peixe, *Artemia*.

### ABSTRACT:

In this study, samples of extruded fish feed produced in Amazonas, Brazil (factories F1 and F2, n = 15 each) had the mycobiota identified and quantified. Some isolates (n=29) were characterized for toxicity against *Artemia salina*; additionally intrinsic pH and moisture were compared at favorable conditions to fungal development. For isolation and quantification, decimal dilutions (up to  $10^{-3}$ ) were inoculated on rose bengal chloramphenicol agar, by spread plate technic, in triplicate,

incubated at 25 °C / 7 days, monitored daily. Obtained cfu/g (F1=1.45x10<sup>2</sup>, F2=3.77x10) below the threshold for animal feed (10<sup>5</sup> cfu/g). Humidity (F1=8.82%, F2=8.21%) and pH (F1=6.64, F2=6.66) were suitable to fungi growth, especially xerophilic. 881 colonies were isolated (F1=85.5%, F2=14.5%) and 15 species identified, with a higher prevalence of *Penicillium implicatum* (F1=22.5%, F2=4.0%), *Penicillium janczewskii* (F1=22.4%, F2=4.1%) and *Penicillium melinii* (F1=21.9%, F2=4.0%). Crude aqueous extracts were submitted to two types of toxicity bioassay - with presence (DPFP) and absence (DPFA) paper filter disc - which confirmed the *Artemia salina* sensitivity to myco-metabolites. There were mixed results in some isolates of *Absidia cylindrospora* and *P. janczewskii* (toxic when DPFP, highly toxic when DPFA). Nevertheless, statistically, bioassays aqueous extracts are not influenced by paper disk filter presence. Only *A. cylindrospora* and *Penicillium paxillii* showed no toxicity. Despite the good quality of extruded feed, these microorganisms occurrence is worrying due severe bioactivity of extrolits from isolates and relative metabolites stability to food processing, meaning risks to productivity, animal health and consumers of farmed fish.

Index terms: fungi, mycotoxins, feed, fish, *Artemia*.

## INTRODUÇÃO

Insumos agrícolas utilizados na produção de ração animal, como grãos de cereais, são substratos comumente associados à presença de microrganismos, com predominância de fungos. Algumas espécies fúngicas, após parasitismo do vegetal ou pelo hábito sapróbio durante a pós-colheita, podem produzir biocompostos com importantes efeitos tóxicos. Essa propriedade torna os animais mais suscetíveis aos efeitos deletérios após ingestão desses insumos (HUSSEIN; BRASEL, 2001; HUWIG et al., 2001; HASHIMOTO et al., 2003; ACCENSI et al., 2004; CRAVET; LECOEUR, 2006).

*Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são exemplos de fungos com significativo impacto na sociedade moderna. Entre os diversos problemas ocasionados por esses fungos anamórficos, tem evidência as micotoxinas, que causam diferentes efeitos tóxicos para o homem e outros animais (SCUSSEL, 2000; CAZZANIGA et al., 2001; BENNETT; KLICH, 2003; LEUNG et al., 2006).

A análise de toxicidade dos compostos extracelulares oriundos dos fungos pode ser verificada por bioensaios in vitro. Um modelo experimental alternativo – o microcrustáceo *Artemia salina* – é uma ferramenta economicamente viável e para análise preliminar de toxicidade e expressa importante correlação ( $r= 0,85$ ;  $p<0,05$ ) quando comparado aos ensaios com camundongos (PARRA et al., 2001; RICE; MANESS, 2004; GONZÁLEZ et al., 2007).

A piscicultura vem sendo uma atividade de significativa expansão no Estado do Amazonas (SUFRAMA, 2003). Esta condição está contribuindo para o desenvolvimento de programas para o controle de qualidade de ração comercial para peixes, considerando o risco de contaminação humana indireta pelo consumo de alimentos contendo micotoxinas, a exemplo de peixes cultivados (HUSSEIN; BRASEL, 2001; HASHIMOTO et al. 2003).

Diante da relativa ausência de dados sobre espécies de fungos em rações para peixes e considerando a importância de biocompostos sintetizados por esses microrganismos em alimentos, esse trabalho teve como objetivo quantificar e identificar as espécies, além de caracterizar o potencial de toxicidade dos extrólitos produzidos pela microbiota isolada de rações comerciais extrusadas fabricadas no Estado do Amazonas, largamente utilizadas na criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e matrinxã (*Brycon amazonicum*).

## **METODOLOGIA**

### **Amostragem**

Para isolamento dos fungos foram coletadas 30 amostras de ração extrusada utilizada na alimentação de peixes cultivados. As amostras foram obtidas em duas fábricas localizadas em Manaus, Amazonas-Brasil, no período de março a junho de

2007. Em cada fábrica, após a saída do silo de empacotamento, foram coletadas 15 amostras, cada uma pesando 1,3 Kg. As amostras de ração, no momento da coleta foram acondicionadas em embalagens plásticas fornecidas pelo fabricante e conservadas em ambiente seco até o processamento das análises laboratoriais.

### **Isolamento e identificação dos fungos**

Isolamento primário dos fungos - No Laboratório de Micologia, do Instituto de Ciências Biológicas(ICB)/Universidade Federal do Amazonas(UFAM), em condições assépticas, cada embalagem contendo a amostra (1,3 Kg) foi externamente desinfetada com álcool 70% e, em seguida, todo o conteúdo foi submetido à técnica de quarteamento para retirada de 25 g (BRASIL, 1991). Esse quantitativo foi parcialmente triturado e adicionado em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v) suplementada com Tween 80 0,05% (v/v), submetida à agitação (200 rpm/60 min), obtendo-se três diluições sucessivas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). De cada diluição foi retirado 200  $\mu$ L para semeadura na superfície de ágar rosa bengala 0,005% (p/v) suplementado com cloranfenicol 0,01% (p/v) (JARVIS, 1973; SANTOS et al., 1998; MARTINS; MARTINS, 2001; ATAYDE et al., 2005). Todos esses procedimentos foram efetuados em triplicata.

O crescimento dos fungos foi observado nos cultivos, a cada 24 horas, durante sete dias, determinando-se o quantitativo das unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de produto.

Os fungos isolados foram identificados com base nas características macro e micromorfológicas (HESSELTINE; ELLIS, 1964; RAPER; FENNEL, 1977; PITT, 1985; KLICH;PITT, 1994). As espécies foram conservadas em água destilada esterilizada e depositadas na Coleção de Cultura DPUA.

### **Teste de toxicidade utilizando *Artemia salina***

Produção de biocompostos: fermentação submersa - Para produção de biocompostos utilizou-se 20 mL de meio líquido: extrato de levedura 2% (p/v) sacarose 15% (p/v) – YES, em frasco de Erlenmeyer de 125 mL. Uma alíquota de suspensão de esporos de culturas puras foi transferida para o YES, de maneira a se obter  $10^6$  esporos/mL. Os cultivo foram incubados a 25 °C, 180 rpm, durante sete dias. Após esse período, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo. O pH do extrato bruto foi ajustado a 6,5 e posteriormente utilizados no bioensaio em larvas de *A. salina* (HARWIG; SCOTT, 1971; SALLENAVE-NAMONT et al., 2000).

Eclosão dos cistos de *A. salina* - Para eclosão dos cistos de *A. salina*, modificou-se o método proposto por Harwig; Scott (1971). A solução salina foi substituída por 100 mL de solução de sal marinho não iodado 3% (p/v), pH 6,5, esterilizada a 121 °C/45 min em frasco de Erlenmeyer de 500 mL. Nessa solução foi inoculado 200 mg de cistos comerciais, mantendo-se os cultivos a 30 °C, 140 rpm e iluminação constantes por 36 horas.

Bioensaio de toxicidade utilizando *A. salina* - Em cada bioensaio realizado em placa multipoço 6x4, com ou sem disco de papel de filtro, respectivamente CDPF e SDPF, medindo 7 mm foi inoculado 300 µL de extrato bruto e 1000 µL de suspensão de larvas de *A. salina*. Como controle foi utilizando larvas em solução de sal marinho 3% (p/v). Todos os testes foram realizados em triplicata. As placas foram mantidas sob luminosidade (40 watts), 30 °C (HARWIG; SCOTT, 1971). Após 24 horas, a

mortalidade de *A. salina* foi determinada em estereomicroscópio com base na imobilidade interna ou externa, durante 20 segundos (FORGIARINI, 2006).

Ao término da contagem dos náuplios mortos, cinco gotas de formol foram adicionadas em cada poço para contagem do total de larvas presentes. A taxa de mortalidade foi determinada em  $\% \text{ mortalidade} = (\text{número de indivíduos mortos} \times 100) \div \text{número total de indivíduos}$  e o grau de toxicidade foi classificado de acordo a mortalidade observada: 0-9% = não tóxico(NT); 10-49% = ligeiramente tóxico(LT); 50-89% = tóxico(T); 90-100% = altamente tóxico(AT) (HARWIG; SCOTT, 1971; FORGIARINI, 2006). Quando constatada mortalidade no controle, o índice de mortalidade observado nos extratos foi corrigido conforme a fórmula:  $\% \text{ mortalidade corrigido} = \% \text{ entre sobreviventes no branco} - \% \text{ de sobreviventes no tratamento}$  (HARWIG; SCOTT, 1971; GONZÁLEZ et al., 2007).

### **Determinação da umidade e pH da ração extrusada**

A umidade foi determinada em três gramas de cada amostra de ração, previamente triturada em moinho manual. A secagem do produto foi realizada a 105 °C (CUNNIF, 1995), até peso constante. Para determinação de pH, 10 gramas de cada amostra foram trituradas em moinho manual e adicionadas em 90 mL de água deionizada. Cada suspensão foi submetida à agitação por cinco minutos e, após sedimentação, foi realizada a leitura em potenciômetro digital (FILIPCEV et al., 2007). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### **Análise estatística**

Para verificação da diferença entre a umidade e UFC/g nas diferentes amostras de rações, utilizou-se o teste não-paramétrico Mann-Whitney devido a não

normalidade das médias dessas variáveis. Para verificação da influência das variáveis físico-químicas na contaminação por fungos, utilizou-se a análise de covariância. Os resultados dos ensaios de toxicidade foram submetidos ao Teste Qui-Quadrado para verificação de independência entre a expressão de toxicidade do microrganismo e as duas formas de bioensaio utilizadas no experimento. Para todas as análises o nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico MINITAB Release 12.1 em versão acadêmica (MINITAB® 14.1, 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da qualidade micológica das 30 amostras de rações comerciais extrusadas está demonstrada na tabela 1.

Tabela 1 – Comparação dos índices de Unidades Formadoras de Colônia, umidade e pH e verificação da influencia isolada ou interação dessas características físico-químicas na contaminação micobiana das rações comerciais extrusadas fabricadas no Amazonas

VARIÁVEIS ANALISADAS	RAÇÃO		p valor*	INFLUÊNCIA NA CONTAMINAÇÃO	
	F1	F2		F	p valor*
UFC/g	$1,45 \times 10^2$	$3,77 \times 10$	0,0009	-	-
Umidade (%)	$8,82 \pm 0,03$	$8,21 \pm 0,03$	0,2101	0,4797	0,4905
pH	$6,64 \pm 0,04$	$6,66 \pm 0,06$	0,2060	1,1332	0,2902
Umidade*pH	-	-	-	0,4772	0,4917

\*valores menores que 0,05 foram considerados significativos; F1=fornecedor 1; F2=fornecedor 2

A análise estatística desses dados mostrou que o quantitativo de UFC apresentou diferença significativa. Em média, a maior contaminação por fungos ( $1,45 \times 10^2$ ) foi verificada nas amostras de ração do fornecedor 1 (F1). Embora a



legislação brasileira não estabeleça limites de contaminação por fungos em produtos utilizados como alimento animal, os índices de fungos contaminantes detectados em ambas as rações foram inferiores a  $10^5$  UFC/g, limite recomendado para substratos vegetais destinados a alimentação animal (QUEIROZ et al., 2005).

Nesses produtos, a umidade e os valores de pH foram  $8,82\pm 0,03$ ;  $8,21\pm 0,03$  e  $6,64\pm 0,04$ ;  $6,66\pm 0,06$ , F1;F2, respectivamente (Tabela 1). Os resultados de umidade e pH desses produtos não apresentaram diferenças significativas, assim como não exerceram influência na contaminação das rações por fungos. Além disso, não foi observada a interação entre a umidade e o pH sobre a contaminação por fungos.

No entanto, os dados demonstrados na tabela 1 apontam que as rações analisadas proporcionam condições para o desenvolvimento de fungos, especialmente de representantes xerófilos, a exemplo de *Eurotium* (KOZAKIEWICZ, 1989; DEACON, 1997; SCUSSEL, 1998; MARINI et al., 2007).

Da totalidade de amostras das rações analisadas foram isoladas 881 colônias de fungos: 85,5% (ração F1) e 14,5% (ração F2) (Tabela 2). Esses isolados compreenderam representantes de fungos anamorfos (deuteromycetes) (92,2%), Filo Zygomycota (4,1%) e Filo Ascomycota (0,7%). De acordo com as citações de Guarro et al (1999), os fungos anamorfos são forma-gênero que representam a forma conidial dos Ascomycota e Basidiomycota, cujos corpos de frutificação raramente são formados na natureza ou ausente no ciclo vital. Entre os representantes dos deuteromicetos e Zygomycota várias espécies são oportunistas, sendo o primeiro grupo também denominado de fungos com potencial toxigênico, inclusive podem ser agentes de patologias tanto no homem quanto nos demais animais (ABARCA, 2000; MARINI et al., 2007). Outros fungos detectados foram os

denominados de Micelia sterilia (F1=1,7% e F2=1,4%), definido por Carlile; Watkinson (1996), como fungos que não formam esporos, exceto clamidosporo.

Nas amostras de ração F1 e F2 (Tabela 2), os deuteromycetes totalizaram em 703 e 109, enquanto os representantes do Filo Zygomycota e Ascomycota em 34 e 2, 1 e 5, respectivamente. *Penicillium* (90,2%); *Cladosporium* (1,8%); *Trichoderma* (0,1%) e *Aspergillus* (0,1%) foram os representantes dos deuteromycetes. *Absidia* e *Eurotium* foram os únicos representantes dos Filos Zygomycota (4,1%) e Ascomycota (0,6%), respectivamente. Embora a diversidade de fungos nas amostras de ração dos dois fornecedores não tenha sido similar, *Penicillium* foi o predominante em ambas (F1=77,8% e F2=12,4%), tabela 2. Sallenave-Namont et al. (2000), ao analisar solo, água e moluscos marinhos, entre outros, também isolou *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Trichoderma*, predominando entre esses o gênero *Penicillium*.

Dos 881 isolados foram identificadas 15 espécies distribuídas de forma diversificada entre as rações (Tabela 2), observando-se a maior prevalência de *Penicillium implicatum* (26,4%), *Penicillium janczewskii* (26,4%) e *Penicillium melinii* (25,9%) (Tabela 2). As espécies com ocorrência nas amostras de ração de ambos os fornecedores apresentaram a seguinte frequência: *P. implicatum* (F1= 22,5% e F2= 4,0%), *P. janczewskii* (F1=22,4% e F2=4,1%), *P. melinii* (F1=21,9% e F2=4,0%), *Absidia cylindrospora* (F1=3,9% e F2=0,2%) e *Eurotium amstelodami* (F1=0,1% e F2=0,2%) (Tabela 2). As espécies *Penicillium miczynskii* (7,2%), *Cladosporium cladosporioides* (1,8%), *Penicillium janthinellum* (1,8%), *Penicillium simplicissimum* (1,7%), *Penicillium waksmanii* (0,2%), *Aspergillus carbonarius* (0,1%), *Penicillium citreonigrum* (0,1%) e *Trichoderma koningii* (0,1%) ocorreram somente em F1. Por vez, *Eurotium chevalieri* (0,3%) e *Penicillium paxillii* (0,3%)

ocorreram somente em F2 (Tabela 2).

Tabela 2 – Diversidade de fungos em rações extrusadas, fabricadas e comercializadas no Estado do Amazonas, Brasil.

TAXA	RAÇÃO F1		RAÇÃO F2		AMBAS AS RAÇÕES	
	ISOLADOS		ISOLADOS		ISOLADOS	
	N	%*	n	%*	N	%**
<b>Filo Zygomycota</b>						
<i>Absidia cylindrospora</i>	34	3,9	2	0,2	36	4,1
<b>Fungos anamorfos</b>						
<i>Aspergillus carbonarius</i>	1	0,1	0	0,0	1	0,1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	16	1,8	0	0,0	16	1,8
<i>Penicillium citreonigrum</i>	1	0,1	0	0,0	1	0,1
<i>Penicillium implicatum</i>	198	22,5	35	4,0	233	26,5
<i>Penicillium janczewskii</i>	197	22,4	36	4,1	233	26,5
<i>Penicillium janthinellum</i>	16	1,8	0	0,0	16	1,8
<i>Penicillium melinii</i>	193	21,9	35	4,0	228	25,9
<i>Penicillium miczynskii</i>	63	7,2	0	0,0	63	7,2
<i>Penicillium paxilli</i>	0	0,0	3	0,3	3	0,3
<i>Penicillium simplicissimum</i>	15	1,7	0	0,0	15	1,7
<i>Penicillium waksmanii</i>	2	0,2	0	0,0	2	0,2
<i>Trichoderma koningii</i>	1	0,1	0	0,0	1	0,1
<i>Sub-total</i>	<b>703</b>	<b>79,8</b>	<b>109</b>	<b>12,4</b>	<b>812</b>	<b>92,2</b>
<b>Filo Ascomycota</b>						
<i>Eurotium amstelodami</i>	1	0,1	2	0,2	3	0,3
<i>Eurotium chevalieri</i>	0	0,0	3	0,3	3	0,3
<i>Sub-total</i>	<b>1</b>	<b>0,1</b>	<b>5</b>	<b>0,5</b>	<b>6</b>	<b>0,6</b>
Micelia sterilia	15	1,7	12	1,4	27	3,1
<b>TOTAL</b>	<b>753</b>	<b>85,5</b>	<b>128</b>	<b>14,5</b>	<b>881</b>	<b>100,0</b>

LEGENDA: n=quantidade de fungos isolados em amostras de cada fábrica; N=quantidade de fungos isolados em todas as amostras; %=prevalência em amostras de cada fábrica; %\*\*=prevalência em todas as amostras

A tabela 3 está demonstrando os resultados referentes aos testes de toxicidade dos extratos brutos em *Artemia salina*. Das 15 espécies identificadas, os

29 isolados aleatoriamente selecionados para o bioensaio de toxicidade foram *A. cylindrospora* (n=3), *A. carbonarius* (n=1), *C. cladosporioides* (n=2), *E. amstelodami* (n=3), *E. chevalieri* (n=2), *P. citreonigrum* (n=1), *P. implicatum* (n=2), *P. janczewskii* (n=3), *P. janthinellum* (n=2), *P. melinii* (n=2), *P. miczynskii* (n=2), *P. paxilii* (n=1), *P. simplicissimum* (n=2), *P. waksmanii* (n=1) e *T. koningii* (n=2). Os resultados dos testes de toxicidade confirmaram que *A. salina* foi sensível a 93,1% dos extratos brutos obtidos por fermentação submersa e apenas 6,9% dos oriundos de *A. cylindrospora* e *P. paxilii*, não demonstraram toxicidade.

Tabela 3 – Toxicidade de espécies de fungos isolados de rações comerciais extrusadas para peixes fabricadas no Amazonas.

Microorganismo (quantidade relativa)	Com disco de papel de filtro		Sem disco de papel de filtro	
	Mortalidade (%) <sup>*</sup>	Classe <sup>**</sup>	Mortalidade (%) <sup>*</sup>	Classe <sup>**</sup>
<i>Absidia cylindrospora</i> (1/3)	1	NT	1	NT
<i>Penicillium paxilii</i> (1/1)	9		9	
<i>Eurotium amstelodami</i> (1/3)	46	LT	42	LT
<i>Penicillium janthinellum</i> (2/2)	16		13	
<i>A. cylindrospora</i> (1/3)	68	T	67	T
<i>Penicillium citreonigrum</i> (1/1)	62		63	
<i>Penicillium implicatum</i> (2/2)	80	T	76	T
<i>Penicillium janczewskii</i> (1/3)	52		56	
<i>Penicillium simplicissimum</i> (2/2)	83	AT	86	AT
<i>Penicillium waksmanii</i> (1/1)	71		61	
<i>Aspergillus carbonarius</i> (1/1)	100	AT	100	AT
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (2/2)	100		100	
<i>E. amstelodami</i> (2/3)	100	AT	100	AT
<i>Eurotium chevalieri</i> (2/2)	100		100	
<i>P. janczewskii</i> (1/3)	100	AT	99	AT
<i>Penicillium melinii</i> (2/2)	100		100	
<i>Penicillium miczynskii</i> (2/2)	100	AT	100	AT
<i>Trichoderma koningii</i> (2/2)	100		95	
<i>A. cylindrospora</i> (1/3)	79	T	98	AT
<i>P. janczewskii</i> (1/3)	79		97	

LEGENDA: \* média±desvio padrão;

\*\*Classe: NT=não tóxico, LT=ligeiramente tóxico, T=tóxico, AT=altamente tóxico

Dessa forma, observou-se que os extratos brutos testados, com base na taxa de mortalidade de *A. salina* foram classificados em NT (6,9%), LT (10,3%), T (34,5%) e AT (55,2%). *A. carbonarius*, *C. cladosporioides*, *E. chevalieri*, *P. melinii*, *P. miczynskii* e *T. koningii* foram exclusivamente AT. Por sua vez, *E. amstelodami*, apesar de ter um isolado LT, foi na maioria AT (2/3). *P. citreonigrum*, *P. implicatum*, *P. simplicissimum* e *P. waksmanii* foram exclusivamente T, enquanto *P. janthinellum* foi exclusivamente LT (Tabela 3).

Dois isolados, *A. cylindrospora* e *P.janczewskii* não mostraram exclusividade quanto à classificação de toxicidade. *A. cylindrospora* expressou potencial atividade do tipo NT, T e AT e *P. janthinellum*, T e AT. Ainda, nessas espécies verificaram-se resultados diferenciados quanto à forma do bioensaio de toxicidade, sendo classificadas como T quando CDPF e AT quando SDPF (Tabela 3).

Estatisticamente, os níveis de toxicidade verificados nos extratos brutos quando CDPF e SDPF não apresentaram diferença significativa. Quando aplicado o teste Qui-Quadrado para associação entre as variáveis níveis de toxicidade dos extratos brutos e o uso de disco de papel de filtro, verificou-se que a taxa de mortalidade dos extratos aquosos brutos para os diferentes microrganismos não foi afetada pelo uso ou não do disco ( $p=0,682$ ).

Observou-se ainda que os fungos analisados expressaram níveis de toxicidade elevada em relação aqueles testados por Sallenave-Namont (2000), os quais mostraram pouca atividade tóxica contra *A. salina* (35%).

## **CONCLUSÃO**

Verificou-se uma baixa contaminação por fungos nas amostras de rações extrusadas analisadas. Entre os microrganismos identificados, predominaram

espécies de *Penicillium* em ambas as rações amostradas. O pH e umidade do produto foram favoráveis ao desenvolvimento de fungos. Todas as espécies isoladas são contaminantes comuns de substratos agrícolas. Porém, diante da grave atividade biológica dos extrólitos produzidos por estes fungos frente a *A. salina*, a ocorrência desses microrganismos em rações para peixes exige controle não somente pelos prejuízos financeiros e deterioração do produto, mas pelos riscos à produtividade, à saúde desses animais cultivados e ao homem.

## REFERÊNCIAS

ABARCA, Maria de Lourdes; BRAGULAT, Maria Rosa; CASTELLÁ, Gemma; ACCENSI, Francesc; CABAÑES, F. Javier. Hongos produtores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao, v.17, p.863-868, 2000.

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*, Amsterdam, n.21, p.623-27, 2004.

ATAYDE, Hérlon Mota; SILVA, Antônio José Inhamuns; TEIXEIRA, Maria Francisca Simas. Micobiota presente em pescado processado comercializado na cidade de Manaus, Amazonas. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v.19, n.134, p. 89-93, 2005.

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

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S.C. *The Fungi*. 3.ed., London: Academic Press, 1996. 482p.

CAZZANIGA, D.; BASILICO, J.C.; GONZÁLEZ, R.J.; TORRES, R.L.; DE GREEF, D.M. Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. *Letters in Applied Microbiology*, v. 33, n. 2, p. 144-47, 2001.

CRAVET, S.; LECOEUR, S. Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology*, n.44, p. 444-453, 2006.

DEACON, Jim W., *Modern mycology*. 3.ed. U.S.A.: Blackwell Science, 1997.

FILIPCEV, Bojana; SIMURINA, Olivera; BODROZA-SOLAROV, Marija. Effect of native and liophilized kefir grains on sensory and physical attributes of wheat bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, v.3, n. 31, p. 367-377, 2007.

FORGIARINI, Eliane. Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima *horseradish* peroxidase. Florianópolis: UFSC, 2006. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Química), Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

GONZÁLEZ, Ana María; PRESA, Maximiliano; LATORRE, María Gabriela; LURÁ, Maria Cristina. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.24, p.59-61, 2007.

GUARRO, Josep; GENÉ, Josepa; STCHIGEL, Alberto M. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n.3, p.454-500, 1999.

HARWIG, J.; SCOTT, P.M. Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Applied Microbiology*, v.21, n.6, p. 1011-06, 1971.

HASHIMOTO, Elisabete Hiromi; SANTOS, Maria Ângela do; ONO, Elisabete Yurie Sataque; HAYASHI, Cármino; BRACARENSE, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro; HIROOKA, Elisa Yoko. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, v.14, n.1, p. 123-32, 2003.

HESELTIME, C. W.; ELLIS, J. J. The genus *Absidia*: *Gongronella* and cylindrical-spored species of *Absidia*. *Mycologia*, v.56, p. 568-601, 1964.

HUSSEIN, Hussein S.; BRASEL, Jeffrey M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, n.167, p. 101-34, 2001.

HUWIG, Alexander; FREIMUND, Stefan; KÄPPELI, Othmar; DUTLER, Hans. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, Würzburg, Alemanha, n.122, p.179-88, 2001.

JARVIS, B. Comparison of an improved rose-bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of molds and yeasts in food. *Journal of Applied Bacteriology*, n. 36, p. 723-727, 1973.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. *A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Australia, 1994.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. U.K: International Mycological Institute, 1985. p. 185.

LEUNG, Maxwell C. K.; DÍAZ-LLANO, Gabriel; SMITH, Trevor K. Mycotoxins in pet foods: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.26, p. 9623-35, 2006.

MARINI, Leonor João; GUTKOSKI, Luis Carlos; ELIAS, Moacir Cardoso; SANTIN, João Anaracy. Qualidade de grãos de aveia sob secagem intermitente em altas temperaturas. *Ciência Rural*, v.37, n.5, p.1268-1273, 2007.

MARTINS, H. M; MARTINS, M. L. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal: 1996-199). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. Lisboa, v.96, n.538, p. 85-88, 2001.

PARRA, A. Lagarto; YHEBRA, R. Silva; SARDIÑAS, I. Guerra; BUELA, L. Iglesias. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v.8, n.5, p. 395–400, 2001.

PITT, J.I. A laboratory guide to Common *Penicillium* species. Áustria: CSIRO. Division of Food Research, 1985.

QUEIROZ, Beatriz Dias; KELLER, Kelly Moura; KELLER, Luiz Antonio Moura; RIBEIRO, Jéssica Mara Martins; ROSA, Carlos Alberto da Rocha. Avaliação de substratos vegetais destinados à alimentação animal como suporte para a produção de ochratoxina A por espécies do gênero *Aspergillus* Fr. *Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, v.25, n.1, p.64-70, 2005.

RAPER, K.B.; FENNEL, D.I. The Genus *Aspergillus*. New York: Robert E. Krieger Co., 1977.

RICE, Stanley A.; MANESS, Ian B. Brine Shrimp Bioassays: a useful technique in biological investigations. *The American Biology Teacher*, v.66, n.3, p. 208-14, 2004.

SALLENAVE-NAMONT, C.; POUCHUS, Y.F.; ROBIU DU PONT, T.; LASSUS, P.; VERBIST, J.F. Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. *Mycopathologia*, n.149, p. 21-5, 2000.

SANTOS, Isabel M.; VENÂNCIO, Armando; LIMA, Nelson. *Fungos contaminantes na indústria alimentar*, 1.ed., Braga: Micoteca da Universidade do Minho, 1998.

SCUSSEL, Vildes Maria. *Micotoxinas em alimentos*, 1.ed. Santa Catarina: Editora Insular Ltda., 1998.

\_\_\_\_\_. *Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos*. 1.ed. Santa Catarina: Editora Vildes Maria Scussel, 2000.

SUFRAMA. *Potencialidades – estudo de viabilidade econômica*. v.8, 2003. 17p. Manaus