

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**Estudo sobre a contaminação com espécies
toxígenas, potencialmente produtoras de
micotoxinas, em rações destinadas
à alimentação de equinos.**

Kelly Moura Keller

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTUDO SOBRE A CONTAMINAÇÃO COM ESPÉCIES TOXÍGENAS,
POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE MICOTOXINAS,
EM RAÇÕES DESTINADAS À ALIMENTAÇÃO DE EQUINOS.**

KELLY MOURA KELLER

Sob a Orientação do Professor
Carlos Alberto da Rocha Rosa

E Co-Orientação da Professora
Lilia Renée Cavaglieri

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal

**Seropédica, RJ
Fevereiro de 2009**

636.1

K29e

T

Keller, Kelly Moura, 1981-

Estudo sobre a contaminação com espécies toxígenas, potencialmente produtoras de micotoxinas, em rações destinadas à alimentação de eqüinos / Kelly Moura Keller - 2009.

64f. : il.

Orientador: Carlos Alberto da Rocha Rosa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 45-54

1. Cavalo - Alimentação e rações - Teses. 2. Fungos - Teses. 3. Micotoxinas - Teses. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

KELLY MOURA KELLER

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19 / 02 / 2009

Carlos Alberto da Rocha Rosa, Ph.D., L.D. - UFRRJ
(Orientador)

Ana Maria Dalcerro, D.Sc. – UNRC, Argentina

Carina Magnoli, D.Sc. – UNRC, Argentina

*Dedico este trabalho à
minha família e amigos, em
especial minha mãe, por seu
amor e dedicação a todo
instante...*

AGRADECIMENTOS

Ao nobre amigo, o cavalo, motivo pelo qual eu ingressei na carreira de veterinária e que também foi a motivação para esta pesquisa. Parte fundamental da minha vida até hoje.

À toda minha família, por sempre ter me apoiado e incentivado e pela compreensão dos momentos de ausência e mal-humor, em especial à minha mãe Cleide e irmão Luiz.

Ao Professor Carlos Alberto da Rocha Rosa pela orientação e pela amizade que cultivamos há vários anos, por sempre ter aberto novas portas para o meu crescimento.

Às Professoras Lilia Renée Cavaglieri e Ana Maria Dalcerro por todos os ensinamentos transmitidos, na prática laboratorial. Por terem me acolhido tão carinhosamente em suas casas e terem me dado o apoio necessário à conclusão deste trabalho.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e os vários amigos que fiz nesta instituição desde os tempos da graduação, e que sempre me apoiaram nessa caminhada: Beatriz Dias Queiroz, Carla Alves Soleiro, Thais Ferreira Fagundes, Juliana Gliosci Delliveneri, entre outros.

À Universidad Nacional de Río Cuarto – Argentina onde também pude fazer muitos amigos, os quais agradeço no nome da Profa. Carina Magnoli, que juntamente com minhas co-orientadoras, me passou valiosos ensinamentos, especialmente em taxonomia de *Penicillium*.

Ao CNPq, órgão financiador desses anos de pesquisa.

Aos funcionários do Projeto Sanidade Animal: Luiz Jorge, Joel, Valéria, Sr. Adevaldo e Valcir pela amizade e suporte técnico às nossas atividades.

À todos os meus amigos do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ, tanto os atuais quanto as pessoas com quem convivi em anos anteriores. Cada um com sua particularidade, contribuindo para o nosso crescimento e aprendizado de vida. Esta família que começou pequenininha com apenas três estagiários e que hoje conta com mais de quinze. Convivendo com alegria, companheirismo e muito trabalho em grupo: Luiz Antonio Moura Keller, Águida Aparecida de Oliveira, Tatiana Xavier de Almeida, Ana Cláudia Marassi, Michele Valadares Deveza, Beatriz de Sousa Monteiro, Lucila Maria Teixeira Nunes, César Daniel Krüger, Marco Antonio Andrade Rodrigues, além de todas as “minhas” estagiárias mais recentes.

À todos vocês, e àqueles que eu possa ter deixado de mencionar, o meu muito obrigada!

RESUMO

KELLER, Kelly Moura **Estudo sobre a contaminação com espécies toxígenas, potencialmente produtoras de micotoxinas, em rações destinadas à alimentação de equinos**. 2009. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

A maioria dos alimentos, cereais e outros produtos agrícolas são muito sensíveis à contaminação por fungos capazes de produzir micotoxinas. Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos que podem provocar efeitos adversos, tais como carcinogênese, teratogênese, nefrotoxicidade e imunossupressão, levando a inúmeras patologias e conseqüentes perdas econômicas. *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os gêneros mais freqüentemente envolvidos em casos de micotoxicoses em animais e humanos. Em equinos, as micotoxicoses estão principalmente relacionadas com alimentos baseados em milho contaminado com fumonisinas (FBs), produzida por *F. verticillioides*. Estas micotoxinas são responsáveis pela leucoencefalomalácia equina (LEME), uma doença neurológica aguda e fatal caracterizada por sintomas neurotóxicos. Mais de uma micotoxina pode existir simultaneamente em um determinado produto ou ingrediente. Geralmente, os efeitos dessas toxinas tendem a ser aditivos e em resposta sinérgica, aumentando o risco e perigo para a saúde animal e a produtividade. Aflatoxinas (AFs) são micotoxinas produzidas por *A. flavus* e *A. parasiticus*. A aflatoxina B₁ (AFB₁) é a mais freqüentemente detectada e que tem sido descrita como a mais forte substância hepatocarcinógena biologicamente sintetizada, que pode afetar os seres humanos e animais. A determinação da qualidade micológica e micotoxicológica, o controle de alimentos e produtos destinados ao consumo equino são fatores críticos para melhorar a produção animal e seu desempenho. Os objetivos deste estudo foram: 1) determinar a ocorrência de *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp., 2) detectar e quantificar FB₁ e AFB₁ em alimentos para equinos. Sessenta amostras de diferentes rações comerciais, aveia e ração batida na fazenda foram coletadas aleatoriamente a partir de diferentes estabelecimentos hípicas localizados no Rio de Janeiro e Seropédica, entre Junho de 2003 a Junho de 2006. A análise da micobiota foi feita pelo método de diluição em placa sobre os meios de cultivo dicloran rosa bengala cloranfenicol agar (DRBC), dicloran glicerol 18% agar (DG18) e Nash-Snyder agar. As contagens fúngicas totais foram expressas em UFC/g. Foram determinadas a freqüência de isolamento (%) dos gêneros fúngicos e a densidade relativa das espécies. A determinação das micotoxinas foi feita utilizando kits comerciais ELISA (Beacon Analytical Systems Inc.). As contagens fúngicas totais foram similares em ambos os meios DRBC e DG18. As maiores contagens foram observadas em amostras de aveia e ração batida na fazenda. *Aspergillus* (43%), *Penicillium* (26%) e *Fusarium* (11%) foram os gêneros mais freqüentemente isolados. *Aspergillus niger* (27%), *A. flavus* (25%), *Penicillium corylophilum* (19%), *P. fellutanum* (14%) e *Fusarium verticillioides* (100%) apresentaram as maiores densidades relativas. Setenta e cinco por cento das amostras apresentaram contaminação com FB₁ com níveis de não detectado a 8,5 µg.g⁻¹. Apenas duas amostras foram negativas para contaminação por AFB₁ com intervalo de 0,5 a 99,4 µg.kg⁻¹. Recomenda-se que o milho contaminado ou subprodutos seja limitado a um máximo de 20% da dieta de equinos. Mesmo que a quantidade de micotoxinas produzidas não seja suficiente para causar efeitos adversos nos animais, é um sinal de que os alimentos serão menos nutritivos. Também é necessário estabelecer limites máximos de contagens fúngicas para espécies potenciais produtoras de AFs e FBs.

Palavras chave: fungos, micotoxinas, equinos.

ABSTRACT

KELLER, Kelly Moura. **Study on contamination with toxigenic species, potentially producing mycotoxins, in feeds intended for feeding horses.** 2009. 64p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences, Animal Health). Veterinary Institute, Veterinary Microbiology and Immunology Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Most feedstuffs, cereal crops and other agricultural commodities are very susceptible to contamination by molds able to produce mycotoxins. Mycotoxins are toxic secondary metabolites that can cause adverse effects such as carcinogenesis, teratogenesis, nephrotoxicity and immunosuppression, leading to numerous pathologies and consequent economic losses. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* are the most frequently genera involved in animal and human cases of mycotoxicoses. In equines, mycotoxicoses are mainly related to corn based feedstuffs consumption contaminated with fumonisins (FBs) produced by *F. verticillioides*. These mycotoxins are responsible for equine leukoencephalomalacia (ELEM), an acute and fatal neurological disease characterized by neurotoxic symptoms. More than one mycotoxin may exist simultaneously in a particular commodity or ingredient. Generally, the effects of these toxins tend to add up in synergic response, increasing the risk and hazard to animal health and productivity. Aflatoxins (AFs) are mycotoxins produced by *A. flavus* and *A. parasiticus*. Aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most frequently detected and it has been described as the strongest biologically synthesized hepatocarcinogenic substance that can affect humans and animals. Checking the mycological and mycotoxicological quality, control of feedstuffs and commodities destined to equine consumption is critical for improving animal production and performance. The purposes of this study were: 1) to determine the occurrence of *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Fusarium* spp., 2) to detect and quantify FB₁ and AFB₁ in equine feedstuffs. Sixty samples from different commercial feeds, oats and farm-made feeds were randomly collected from different studs located in Rio de Janeiro and Seropédica, from June 2003 to June 2006. Analysis of the mycobiota was made by the plate dilution spread method onto dichloran rose bengal chloranphenicol agar (DRBC), dichloran glycerol 18% agar (DG18) and Nash-Snyder culture media. Total fungal counts were expressed as CFU/g. The isolation frequency (%) of fungal genera and relative density (%) of fungal species were determined. Mycotoxins determination was done using commercial ELISA kits (Beacon Analytical Systems Inc.). Total fungal counts were similar on both DRBC and DG18 media. The highest counts were from oats and farm-made feeds. *Aspergillus* (43%), *Penicillium* (26%) and *Fusarium* (11%) were the most frequently isolated genera. *Aspergillus niger* (27%), *A. flavus* (25%), *Penicillium corylophilum* (19%), *P. fellutanum* (14%) and *Fusarium verticillioides* (100%) had the highest relative densities. Seventy five percent of the samples showed FB₁ contamination with range from not detected to 8.5 µg.g⁻¹. Only two samples were negative for AFB₁ contamination with range from 0.5 to 99.4 µg.kg⁻¹. It is recommended that contaminated corn or corn by-products be limited to no more than 20% of the diet for equids. Even if the amount of mycotoxins produced is not enough to cause adverse effects in animals, it is a sign that the feed will be less nutritious. It is also necessary to establish maximum limits of fungal counts for potential AFs and FBs species.

Key words: fungi, mycotoxins, horses.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Potencial toxígeno das principais espécies de <i>Aspergillus</i> que contaminam produtos vegetais.	9
Tabela 2: Potencial toxígeno das principais espécies de <i>Penicillium</i> que contaminam produtos vegetais.	14
Tabela 3: Potencial toxígeno das principais espécies de <i>Fusarium</i> que contaminam produtos vegetais.	17
Tabela 4: Contagem total dos fungos filamentosos isolados de alimentos fornecidos à equinos.	33
Tabela 5: Percentual de amostras contaminadas acima dos limites recomendados.	34
Tabela 6: Média e desvio padrão dos níveis de FB ₁ quantificados através de ELISA, nas diferentes categorias de alimentos fornecidos à equinos.	39
Tabela 7: Média e desvio padrão dos níveis de AFB ₁ quantificados através de ELISA, nas diferentes categorias de alimentos fornecidos à equinos.	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Diagrama parcial do estudo do complexo do agronegócio do cavalo.	3
Figura 2: Exemplo de ração comercial para eqüinos.	4
Figura 3: Características morfológicas básicas representativas do gênero <i>Aspergillus</i> .	7
Figura 4: “a – e”, tipos de ramificações do conidióforo: a e b, simples; c, biverticilado; d, triverticilado; e, quaterverticilado. “f – k”, tipos de colônias: f, aveludada; g, algodonosa; h, funicular; i - k, fasciculada.	10
Figura 5: A-B colônia aveludada. B típico exsudato amarelo. C colônia aveludada que está se tornando fasciculada com o tempo. D grandes e compactas cabeças conidiais. E colônia flocosa. F esclerócios. G-I colônias fasciculadas. J blocos de massas conidiais em colônia de 10 dias de idade. K-L colônia sinemmata.	12
Figura 6: Chave taxonômica básica para o gênero <i>Penicillium</i> e seus teleomorfos.	13
Figura 7: a, Macroconídios; b, Microconídios; c, Monofiálides.	16
Figura 8: a, Disposição de clamidosporos; b, Conídios em cadeia e falsa cabeça (círculo vermelho).	16
Figura 9: Esquema do provável modo de atuação das fumonisinas.	22
Figura 10: Esquema de diluição de amostra e contagem padrão de unidades formadoras de colônias (UFC g ⁻¹).	28
Figura 11: Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero <i>Aspergillus</i> nos meios CYA, MEA e CY20S em duas condições de temperaturas.	29
Figura 12: Esquema de inoculação e incubação das duas cepas do gênero <i>Penicillium</i> a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperatura (5, 25 e 37° C).	29
Figura 13: Esquema de incubação das cepas do gênero <i>Fusarium</i> nos diferentes meios de cultivo até sua identificação final.	30
Figura 14: Princípio de purificação das colunas de imunoafinidade.	32
Figura 15: Frequência (%) de gêneros fúngicos isolados dos alimentos destinados à eqüinos.	35
Figura 16: Densidade relativa (%) de espécies de <i>Aspergillus</i> em alimentos destinados à eqüinos.	36
Figura 17: Densidade relativa (%) de espécies de <i>Penicillium</i> em alimentos destinados à eqüinos.	37
Figura 18: Níveis de contaminação de FB ₁ quantificados através de ELISA, nas diferentes categorias de alimentos fornecidos à eqüinos.	39
Figura 19: Regressão linear do <i>kit</i> ELISA para quantificação de FB ₁ .	40
Figura 20: Níveis de contaminação por AFB ₁ quantificados através de ELISA, nas diferentes categorias de alimentos fornecidos à eqüinos.	41
Figura 21: Regressão linear do <i>kit</i> ELISA para quantificação de AFB ₁ .	41
Figura 22: Percentual de amostras dos alimentos destinados à eqüinos, contaminadas segundo cada legislação.	42

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Complexo do agronegócio do cavalo no Brasil	3
2.2 Os Fungos	5
2.2.1 Gênero <i>Aspergillus</i>	7
2.2.2 Gênero <i>Penicillium</i>	10
2.2.3 Gênero <i>Fusarium</i>	15
2.4 Micotoxinas e micotoxicoses: características gerais	18
2.5 Aflatoxinas	19
2.6 Fumonisinias	20
2.6.1. Modo de atuação das fumonisinias	21
2.7- Outras micotoxinas de importância para os equinos	23
2.7.1 Ocratoxina A	23
2.7.2 Citrinina	23
2.7.3 Eslaframina	23
2.7.4 Toxinas tremorgênicas	24
2.7.5 Tricotecenos	24
2.7.6 Zearalenona	24
2.7.7 Rubratoxinas	25
2.8 Métodos de detecção das micotoxinas	25
2.9 Estudos preliminares	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Amostragem	27
3.2 Determinação da micoflora	27
3.3 Isolamento e identificação fúngica	28
3.4 Caracterização do perfil toxígeno das espécies isoladas	30
3.5 Detecção e quantificação de AFB ₁ e FB ₁ por ELISA	31
3.6 Detecção e quantificação de AFB ₁ por HPLC	31
3.7 Análises estatísticas	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Contaminação fúngica	33
4.2 Determinação da micobiota	35
4.3 Perfil toxígeno: habilidade como produtor	38
4.4 Análises micotoxicológicas	38
4.4.1 Fumonisinina B ₁	38
4.4.2 Aflatoxina B ₁	40
5. CONCLUSÕES	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
7. ANEXO	55
A - PRANCHAS FOTOGRÁFICAS	55

1- INTRODUÇÃO

Os negócios que envolvem a criação e utilização do cavalo ocupam uma posição de destaque nos países desenvolvidos e em muitos daqueles em desenvolvimento, como o Brasil; porém, ao contrário de bovinos, aves, suínos e ovinos, os eqüinos não aparecem com destaque nas pesquisas e censos governamentais.

O Brasil conta com o terceiro maior rebanho eqüino do mundo, com 5,9 milhões de cabeças (IBGE, 2003), e o agronegócio do cavalo movimenta cerca de 7,3 bilhões de reais/ano. Podemos dividir este complexo de atividades em diferentes segmentos e dentro destes, os cavalos de trabalho, os cavalos de esporte, e o segmento consumidor de carne ocupam destaque.

Nosso país é o 5º maior exportador mundial de carne de cavalo, movimentando cerca de R\$ 80 milhões/ano. A categoria de cavalos de esportes e de trabalho movimenta cerca de R\$ 840 milhões/ano e engloba diversas atividades.

Neste contexto, o segmento de rações e medicamentos veterinários são responsáveis pelos elevados gastos impostos aos proprietários destes animais, por isso faz-se necessário um rigoroso controle de qualidade das rações destinadas à alimentação de eqüinos através, por exemplo, do reconhecimento de espécies fúngicas toxígenas, a fim de preservar a saúde animal, minimizando os gastos com medicamentos e veterinários.

Os cereais pertencem, desde épocas remotas, à categoria dos nutrientes essenciais à humanidade. Eles serviam como unidade de medida na antiguidade, sendo usados até mesmo para o pagamento de impostos e tributos. Com o decorrer dos anos quase não houve mudanças no papel nutricional destes nutrientes, que constituem a base da alimentação, não só do homem, mas também das diferentes espécies animais: bovinos, eqüinos, caninos, felinos, pássaros, peixes, roedores, etc. Como características nutricionais gerais destacamos a alta concentração de amido, bons níveis de proteína, excelente digestibilidade e baixos teores de fibras. Os principais cereais utilizados em formulações de rações para eqüinos são: milho, aveia, trigo e soja, entre outros.

Os fungos (também denominados mofos ou bolores) são microrganismos multicelulares e filamentosos, que ao infectarem os grãos e alimentos podem produzir substâncias tóxicas tais como micotoxinas. O prejuízo causado pelas toxinas de fungos não deve ser menosprezado, pois ao serem ingeridas, inaladas ou absorvidas pela pele podem causar manifestações de sua ação que podem variar de vômitos ocasionais a convulsões e morte repentina. No caso de grãos, estes podem ser infestados durante o cultivo ou no período pós-collheita. Desta forma, os fungos são classificados em fungos do campo e fungos do armazenamento.

Muitas espécies podem desenvolver-se utilizando os grãos como substrato, no entanto *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. são as mais encontradas; sob condições de armazenagem, com temperatura e atividade de água adequadas, as espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são as que mais proliferam, enquanto que as espécies de *Fusarium* são capazes de crescer e produzir suas toxinas ainda no campo.

Uma ou mais micotoxinas podem ocorrer simultaneamente em determinado substrato, e geralmente apresentam efeitos sinérgicos, o que aumenta o risco e preocupação com relação à saúde e produtividade animal. As fumonisinas (FBs) são uma família de toxinas produzidas principalmente por *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, que são contaminantes amplamente encontrados no milho e em seus produtos derivados. Elas são as causadoras da leucoencefalomalácia eqüina. Já as aflatoxinas (AFs) são produzidas pelos fungos *A. flavus* e

A. parasiticus, os quais podem crescer em grande variedade de substratos quando inadequadamente armazenados. Estas toxinas são potentes causadoras de câncer hepático.

Há grande interesse em estudos que permitam avaliar o risco micotoxicológico das rações para eqüinos de modo a prever a possibilidade de ocorrência de micotoxicoses primárias que afetariam os parâmetros produtivos desses animais; e micotoxicoses secundárias, no caso de ingestão de carnes contaminadas, o que representaria problema para saúde pública. Devido ao potencial de contaminação destas rações por fungos e suas micotoxinas e o fato de ainda ser muito escassa a disponibilidade deste tipo de informação com estudos de monitoramento rotineiro, tanto no Brasil quanto no mundo, há relevância neste trabalho.

1.1- Hipótese

Os alimentos fornecidos à eqüinos são suscetíveis a contaminação pelas principais espécies de fungos toxígenos e suas micotoxinas.

1.2- Objetivos

a) Objetivo Geral

Estabelecer a ocorrência de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* potencialmente produtoras de micotoxinas e determinar a presença de aflatoxina B₁ (AFB₁) e fumonisina B₁ (FB₁) em amostras de rações e aveia laminada achatada, destinadas ao consumo eqüino.

b) Objetivos Específicos

- 1) Realizar a enumeração quantitativa dos propágulos fúngicos das amostras coletadas.
- 2) Determinar a freqüência da micobiota total realizando sua identificação taxonômica em nível de gênero.
- 3) Isolar e identificar espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, estabelecendo a densidade relativa de cada um.
- 4) Caracterizar o perfil toxígeno das espécies isoladas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* através da técnica de cromatografia em camada delgada, TLC (*thin layer chromatography*).
- 5) Detectar e quantificar AFB₁ e FB₁ presentes nas amostras utilizando a técnica de ensaio imunoenzimático, ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*).
- 6) Detectar e quantificar AFB₁ presentes nas amostras utilizando a técnica de cromatografia de imunoafinidade, IAC (*immunoaffinity chromatography*)/ cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (*high performance liquid chromatography*).
- 7) Avaliar os resultados obtidos e realizar análise estatística.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Complexo do agronegócio do cavalo no Brasil

O estudo do complexo do agronegócio cavalo (CNA, 2004) é resultado de pesquisa encomendada pela Confederação Nacional de Agricultura e que dimensiona econômica e socialmente a equinocultura brasileira. Apresento aqui partes deste amplo estudo para que possam correlacionar melhor o panorama atual com esta pesquisa.

O termo “*agribusiness*” foi utilizado pela primeira vez em outubro de 1955 por John Davis referindo-se à todas atividades existentes desde a produção e distribuição dos insumos utilizados na atividade produtiva “dentro da porteira”, a própria atividade, até a comercialização (o que inclui armazenamento, processamento e distribuição) dos produtos e subprodutos originários da atividade agropecuária. A tradicional classificação das atividades em setores estanques – primário, secundário e terciário – tornou-se obsoleta. O complexo do agronegócio do cavalo engloba diversas atividades (Figura 1), além de gerar milhares de empregos diretos e indiretos.

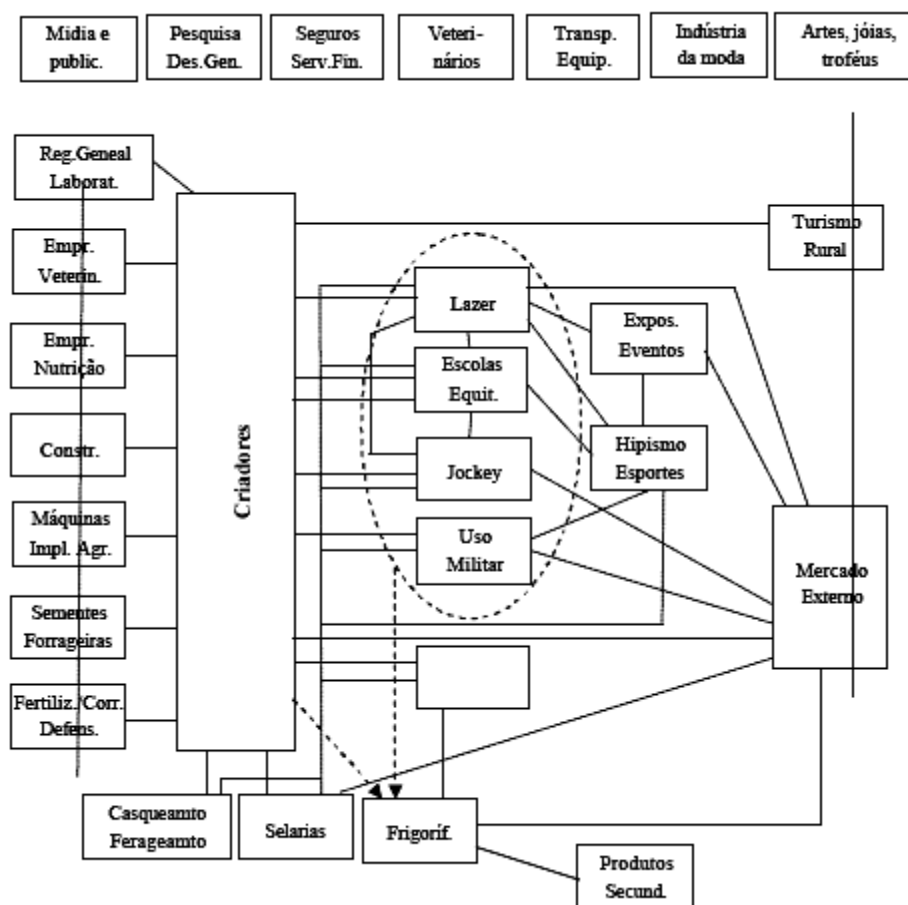


Figura 1- Diagrama parcial do estudo do complexo do agronegócio do cavalo.

Fonte: ESTUDO DO COMPLEXO DO AGRONEGÓCIO CAVALO, Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA)/ Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)/ Universidade de São Paulo (USP).

O cavalo exerceu um importante papel na formação econômica, social e política do Brasil. No aspecto econômico, desempenhou as funções de sela (para o vaqueiro e o peão, nas lides comuns à pecuária); de carga (nos comboios); e, de tração (“motor” de veículos de carga e de moendas). No aspecto social – englobando exibicionismo, vaidade, orgulho e diferenciação social. A partir da segunda metade do século XIX, destacam-se no aspecto social, as atividades de esportes e lazer, como corrida e salto.

O papel do cavalo militar vai além dos aspectos de segurança, tendo sido relevante no desenvolvimento de outras áreas, como a educação e o esporte. Na educação, um bom exemplo é a contribuição do Tenente-Coronel Moniz de Aragão, patrono da Veterinária do Exército. Nos primeiros anos do século passado, ele foi o idealizador e primeiro diretor da Escola de Veterinária, pioneiro no Brasil.

Passando por várias designações, historicamente, a equitação sempre fez parte do treinamento militar. No esporte, até o ano passado, o Exército mantinha a Escola de Equitação localizada na cidade do Rio de Janeiro, no mesmo aquartelamento do Regimento Escola de Cavalaria. Atualmente estas duas unidades encontram-se fisicamente isoladas, porém muito próximas e englobam um efetivo superior a 300 animais. No Exército, os equinos são utilizados para diversas finalidades, tais como: ações de garantia da lei e da ordem nos Regimentos de Cavalaria; participação em cerimonial militar (desfiles, guarda de honra e escoltas de autoridades); patrulhamento em organizações militares e nos campos de instrução; instrução militar nas escolas de formações de oficiais e praças; produção de imunobiológicos (soro antiofídico); prática desportiva, integrando comissões de desportos nacionais; atividades de equioterapia; e, programas de estudos e melhoramentos da equídeocultura nacional, na Coudelaria de Rincão.

Um outro segmento, o do cavalo de trabalho caracteriza-se por animais alimentados com volumoso de beira de estrada ou pasto, milho e farelo de trigo. Eventualmente, utilizam ração, porém de baixo custo. Já a categoria de esportes inclui os centros de treinamento, *jockeys*, propriedades particulares e hípicas; e os cavalos aí incluídos são animais que potencialmente consomem, em média, 4,5 kg de ração por dia (Figura 2).



Figura 2- Exemplo de ração comercial para equinos.

Fonte: ESTUDO DO COMPLEXO DO AGRONEGÓCIO CAVALO, CEPEA/ESALQ/USP.

Atualmente, o mercado total de ração é de 320.000 toneladas anuais, mas estima-se que o potencial do negócio no Brasil seja de 1 milhão de toneladas anuais. O setor nacional é disputado por mais de 30 empresas produtoras de rações comerciais para equinos; três destas detêm 78% do mercado brasileiro. Em pesquisa de campo (CNA, 2004) encontrou-se que o consumo médio diário de ração é de 5,12 kg/animal, quantidade um pouco superior aos dados obtidos na pesquisa de mercado. Isto porque uma parcela da ração fornecida aos cavalos é

fabricada “batida” na própria propriedade. Estima-se que o mercado de rações para equinos movimente R\$ 53.440.000,00 anualmente.

Um outro segmento importante trata-se do mercado consumidor de carne. Como atrativos esta apresenta uma agradável cor vermelha e baixo teor de gordura quando comparada com a carne bovina. No Brasil, a quase totalidade da produção de carne equina destina-se ao mercado externo, sendo desprezível o valor comercializado internamente. Deve-se destacar que a legislação brasileira não permite que um matadouro de bovinos ou outro animal também realize abate de equinos. Sendo assim, apenas sete frigoríficos – distribuídos nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais – respondem pela totalidade do comércio externo de carne de cavalo.

O volume de exportações brasileiras desta carne tem crescido anualmente. Nos últimos 15 anos, entre 1990 e 2005, as exportações setuplicaram, passando de menos de US\$ 5 milhões para valores próximos a US\$ 34 milhões, com crescimento médio anual de 13,8%. Entre os destinos das exportações brasileiras destacam-se Bélgica e Holanda (juntos, respondem por 50,5% das exportações), além de Itália, Japão e França.

Apesar de tudo isso, o principal uso do cavalo no Brasil é ainda o de apoio às diferentes atividades agropecuárias, especialmente na lida do gado bovino. O recente e significativo crescimento da pecuária bovina foi acompanhado por aumento na demanda por equinos para lida. Não obstante a importância do cavalo como animal de trabalho existe uma tendência de crescimento na participação do cavalo de lazer na tropa nacional. Um indicador desta tendência é o crescimento do número de eventos esportivos. Trata-se de um fenômeno mundial, que também ocorre no Brasil.

2.2- Os Fungos

A micologia de alimentos foi negligenciada por vários anos devido a pouca importância dada aos fungos. Estes microrganismos eram vistos, quando contaminantes, apenas pelo aspecto estético. A partir do momento em que se descobriu a importância econômica, por serem deteriorantes, e de saúde pública, por seus metabólitos tóxicos, que revestia sua ação a micologia de alimentos deixa de ser um ponto de interesse apenas dos micologistas e toma seu lugar no contexto da ciência e tecnologia de alimentos, saúde das populações e sanidade animal.

Os fungos juntamente com outros microrganismos, através de um conjunto de enzimas, têm grande relevância na decomposição da matéria orgânica na biosfera, sendo de vital importância na continuidade do ciclo vital. Esta habilidade em degradar substâncias das mais diversas possíveis pode vir a ter efeitos benéficos ou não (SAMSON et al., 2000).

Além da capacidade deteriorante, os fungos quando presentes em produtos agrícolas, alimentos e rações, e sob condições de temperatura e umidade adequadas, são capazes de produzir metabólitos tóxicos, como resultado do seu metabolismo, e dentre estes, há a formação de micotoxinas. As micotoxinas são produtos tóxicos do metabolismo secundário de algumas espécies de fungos que contaminam principalmente produtos vegetais. Elas são produzidas durante o processo metabólico fúngico, quando este é privado de um ou mais nutrientes importantes, em presença de umidade e temperatura adequadas (ROSA, 2002). Causam quadros de intoxicação e morte, de acordo com a quantidade ingerida, tempo de exposição, idade, raça, sexo ou toxinas envolvidas.

A contaminação fúngica causa inúmeros prejuízos sobre a produtividade agropecuária. São responsáveis pela contaminação de parte significativa das safras agrícolas, principalmente em países de clima tropical úmido, em que as tecnologias agrícolas adequadas, principalmente de colheita e pós-colheita, nem sempre estão disponíveis (PIMENTEL, 1991; RUSTOM, 1997).

As condições ideais ao desenvolvimento de fungos são bastante similares às condições requeridas para a produção de micotoxinas. A temperatura ótima para seu crescimento está situada na faixa de 20 - 30°C. A atividade de água (a_w) do substrato é muito importante; valores de a_w inferiores a 0,62 impedem a germinação de qualquer microrganismo. A umidade absoluta do substrato é susceptível a influência da umidade relativa do meio ambiente; podendo, desta forma, tender a hidratação, desidratação ou ao equilíbrio. A luz é essencial para que algumas espécies de fungos tenham o processo germinativo induzido e finalizado, influenciando tanto o crescimento vegetativo como a produção de toxinas. O pH (potencial hidrogeniônico) tem efeito mínimo no metabolismo primário, exercendo maior influência na produção da micotoxina. Os fungos podem se desenvolver na ampla faixa de pH de 2 a 8, onde o pH ótimo está entre 4 a 6,5 (GIMENO, 2008).

Os fungos de campo, como os gêneros *Fusarium* e *Alternaria* crescem sob condições que ocorrem antes da colheita. Usualmente requerem umidade relativa acima de 80% e teor de umidade no grão superior a 22%. Geralmente não crescem após a colheita porque as condições de armazenamento não propiciam a umidade necessária. Primariamente são invasores de sementes de plantas.

Os fungos de armazenamento, como os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* normalmente invadem os grãos intactos antes da colheita. Umidade relativa de 70% e teor de umidade no grão de 14-24% favorecem o crescimento fúngico. Condições que lesam a cutícula dos grãos (p.ex. insetos, estresse pela seca, colheita mecânica e secagem com ar quente) podem aumentar a invasão fúngica por favorecer o acesso do fungo ao substrato.

A contaminação dos alimentos por fungos toxígenos é um fato preocupante, assim, a implementação de medidas de controle, e o melhoramento de metodologias analíticas objetivando respostas mais acuradas e sensíveis para a confirmação e quantificação destes contaminantes, tornam-se a cada dia mais importantes.

Na prática, todos os ingredientes destinados ao consumo humano ou animal têm sido expostos em algum momento no tempo à contaminação fúngica. A natureza e extensão da contaminação determinam a presença ou ausência de micotoxina no produto. A identificação do fungo contaminante pode ser de valor diagnóstico, mas, conclusões positivas apenas podem ser feitas pela extração e identificação da(s) toxina suspeita(s), pois, o fungo pode estar presente e a toxina não, e o contrário também é verdadeiro; além do que uma espécie pode produzir mais de uma toxina, e algumas micotoxinas podem ter mais de um produtor.

Em termos gerais, algumas das formas que se tem citadas para minimizar e/ou evitar os graves problemas que o crescimento e proliferação fúngica podem provocar nos alimentos e nos animais que os consomem são (GIMENO, 2008):

- 1) Compra e recepção de matérias primas de excelente a boa qualidade micológica, com valores de umidade, em geral, menor que 12,5% e menor que 9% para algumas oleaginosas.

- 2) Armazenamento em condições de a_w igual ou inferior a 0,65 e temperatura a 20°C a través de sistemas de monitoramento.

- 3) Higiene e limpeza regular das instalações e dos meios de transportes.

- 4) Sistemas de fumigação e desratização para não permitir o desenvolvimento de insetos, ácaros e roedores.

- 5) Uso de agentes fungistáticos de amplo espectro ou misturas sinérgicas.

- 6) Sistemas de ventilação para controlar rapidamente a temperatura e umidade do local.

- 7) Sistemas de amostragem e análises periódicas para conhecer a todo o momento as condições de armazenamento.

2.2.1- Gênero *Aspergillus*

Com grande importância na contaminação de alimentos, o gênero *Aspergillus* possui mais de 200 espécies, é filamentososo, cosmopolita e um fungo distribuído amplamente na natureza. É comumente isolado do solo, debrís de plantas e, ambientes fechados; encontram-se em maior abundância nas regiões de climas tropicais e subtropicais (PITT; HOCKING, 1997).

Este é um gênero de particular importância devido ao fato de que várias espécies são capazes de crescer e produzir metabólitos em baixas atividades de água e altas temperaturas (MOSS, 1991). Possuem grande versatilidade metabólica e habilidade para dispersar seus conídios pelo ambiente (PITT, 1981).

São bem conhecidos por causarem três sinais clínicos diferentes: infecções oportunistas, onde a imunossupressão é o fator predisponente; estados alérgicos e toxicoses. Estas infecções podem variar desde uma participação local até disseminação completa, daí chamarmos de aspergilose. Entre todos os fungos filamentosos, o gênero *Aspergillus* é, em geral, o mais isolado em infecções invasivas. Quase todos os órgãos ou sistemas do corpo podem ser envolvidos, por exemplo: oncomiçose, sinusite, aspergilose cerebral, meningite, endocardite, miocardite, aspergilose pulmonar, osteomielite, otomíçose, endoftalmite, aspergilose cutânea, aspergilose hepato-esplênica, etc. São comuns as infecções respiratórias em aves e o aborto micótico em bovinos e ovinos causados por este fungo.

As espécies do gênero *Aspergillus* caracterizam-se por seus distintos conidióforos. A base destes, forma um “T” ou “L” que os conecta com uma célula vegetativa chamada de célula pé, ou ainda uma célula separada. O pé estende-se desde a célula pé até expandir-se no ápice em uma vesícula que pode ter diferentes formas. Em algumas espécies, os conídios nascem de estruturas denominadas fiáldes unidas diretamente à vesícula e formam cabeças aspergílares unisseriadas. Em outras espécies, há uma segunda camada de células entre a vesícula e as fiáldes. A esta camada chamamos de metúlas e formam cabeças aspergílares bisseriadas (Figura 3). Estas características estáveis, combinadas com outras primárias e secundárias constituem a base para a taxonomia clássica do gênero (BARROS, 2006).

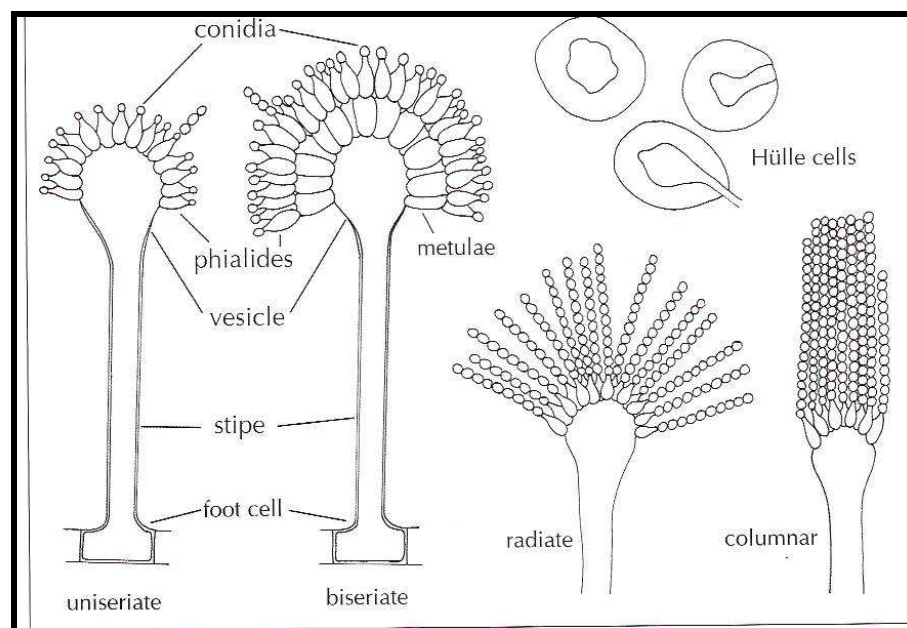


Figura 3- Características morfológicas básicas representativas do gênero *Aspergillus*.

Fonte: SAMSON et al. (2000).

As características macroscópicas mais importantes, do ponto de vista taxonômico, são:
Cor das colônias. Está determinada pela cor dos conídios e constitui uma característica importante para a classificação dos subgêneros.

Diâmetro das colônias. Consiste em medir o diâmetro da colônia logo após o período de incubação de 7 dias. A velocidade de crescimento e a termotolerância são características importantes na identificação.

Cor do micélio. O micélio está composto pelas células vegetativas a partir das quais nascem os conidióforos. O micélio geralmente é branco, porém algumas espécies produzem micélios coloridos característicos.

Cor do reverso da colônia. É incolor a pálido ou amarelo na maioria dos isolados; entretanto, pode ser de laranja ao roxo no *A. versicolor*.

Formação de esclerócios. Certas espécies de *Aspergillus* produzem esclerócios que são estruturas formadas por massas compactas de hifas e que não contém conídios. Variam de tamanho e podem ter forma esférica, subesférica ou elipsoidal. A cor também varia de amarelo a marrom e preto. Os esclerócios funcionam como estruturas de sobrevivência que o fungo utiliza para permanecer no solo e contém uma grande quantidade de metabólitos tóxicos (WICKLOW, 1990). Estes metabólitos são isolados exclusivamente nestas estruturas fúngicas que em combinação com as aflatoxinas podem formar um grande sistema de defesa químico para a proteção dos esclerócios da predação dos insetos (DOWD, 1992; WILLETS; BULLOCK, 1992).

Formação de cleistotécios. São formados nas espécies com estágio sexual (teleomorfo), são estruturas que não têm uma abertura natural e que contém ascos com ascosporas (esporos sexuados).

As características microscópicas mais importantes do ponto de vista diagnóstico são:

Conidióforo. Usualmente os conidióforos não são ramificados e estão compostos por três partes: a célula pé, o pé e a vesícula. A maioria dos conidióforos são não septados, porém podem se observadas septações em certas espécies. A superfície externa ou parede do conidióforo pode ser lisa ou rugosa.

Cabeça conidial. As características da cabeça conidial como sua cor, forma e tamanho são importantes critérios de diagnóstico. A disposição das fiálides sobre a vesícula determina a forma, que pode variar de colunar a radiada.

Vesícula. A vesícula é o ápice engrossado do conidióforo. Sua forma pode variar de globosa, hemisférica, elíptica a alongada (forma de clavas).

Esterigmas. Os esterigmas são células conodiógenas especializadas, as quais desenvolvem-se sobre a área fértil da vesícula. Estes sobre a vesícula podem ser unisseriados ou biseriados, dependendo se uma ou duas camadas de células estão presentes, respectivamente. Os esterigmas primários (primeira camada) são chamados de métulas, enquanto que os secundários (segunda camada) são as fiálides. Nas espécies unisseriadas, as

fiáldes são produzidas diretamente das vesículas, e nas espécies bisseriadas, as fiáldes surgem das méulas.

Conídios (Esporos assexuados). Os conídios, também chamados de esporos, são estruturas reprodutivas assexuadas que servem fundamentalmente para a dispersão. Estes podem ser uni ou multinucleados e sua forma, tamanho e a textura de superfície são características diagnósticas importantes.

Células de Hülle. São células estéreis grandes, de paredes grossas, que carregam um pequeno lúmem e podem estar associadas com os cleistotécios em algumas espécies.

Parede dos cleistotécios e ascosporos. A textura da parede dos cleistotécios junto com a cor, forma e ornamentação dos ascosporos são as características mais importantes na determinação das espécies teleomórficas (KLICH, 2002).

Quase 50 espécies de *Aspergillus* são reconhecidas como capazes de produzir metabólitos tóxicos, porém as micotoxinas mais importantes encontradas em alimentos são: aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), esterigmatocistina e ácido ciclopiazônico (Tabela 1).

Tabela 1- Potencial toxígeno das principais espécies de *Aspergillus* que contaminam produtos vegetais.

Espécies de <i>Aspergillus</i>	Micotoxinas
<i>A. aculeatus</i>	Ácido Secalônico D
<i>A. candidus</i>	Ácido Kójico, Candidulina, Terfenilina, Xantoacina
<i>A. clavatus</i>	Citochalasinina E, Patulina, Clavatol, Triptoquivalonas
<i>A. carbonarius</i>	Rubrofusarina B, Ocratoxina A
<i>A. carneus</i>	Citrinina
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas B ₁ e B ₂ , Aflatrem, Ácido Aspergílico, Ácido Ciclopiazônico, Ácido Kójico, Aflavininas, Ácido 3-Nitropropiónico, Paspalininas
<i>A. fumigatus</i>	Fumitremorgens A e C, Gliotoxinas, Fumigaclavinas, Fumitoxinas, Fumigatinas, Fumagilinas, Espinulosinas, Triptoquivalinas, Verruculogem
<i>A. niger</i>	Ocratoxinas, Malforminas, Naftoquinonas
<i>A. niveus</i>	Citrinina
<i>A. nomius</i>	Aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂), Ácido Aspergílico, Ácido Kójico
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxinas, Ácido Penicílico, Ácido Kójico, Ácido Secalônico A, Xantomegnina, Viomeleina
<i>A. oryzae</i>	Ácido Ciclopiazônico, Ácido Kójico, Ácido 3-Nitropropiónico
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂), Ácido Aspergílico, Ácido Kójico, Aflavininas
<i>A. tamarii</i>	Ácido Ciclopiazônico, Ácido Kójico
<i>A. terreus</i>	Citrinina, Patulina, Citreoviridina, Mevinolina, Territrems, Ácido Terréico, Terramide A
<i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina, Versicolorinas, Nidulotoxinas
<i>A. wentii</i>	Metilxantonas, Ácido 3-Nitropropiónico, Ácido Kójico

Fonte: FRISVAD; SAMSON (1991); PITT; HOCKING (1997).

2.2.2- Gênero *Penicillium*

Os membros deste gênero apresentam grande importância quando se refere à contaminação alimentar; são encontrados em todo o mundo (no solo, vegetação em deterioração e no ar), podendo crescer em baixas temperaturas e a_w .

O gênero apresenta várias espécies e se associa com dois teleomorfos incluídos nos gêneros *Eupenicillium* e *Talaromyces*. As características macroscópicas mais importantes, do ponto de vista taxonômico, são:

Diâmetro, textura e cor do reverso das colônias. As colônias apresentam geralmente crescimento rápido, têm a textura variando de aveludada, algodonosa, funicular ou fasciculada e simnemata (Figura 4 e 5). O reverso da placa é geralmente pálido a amarelado.

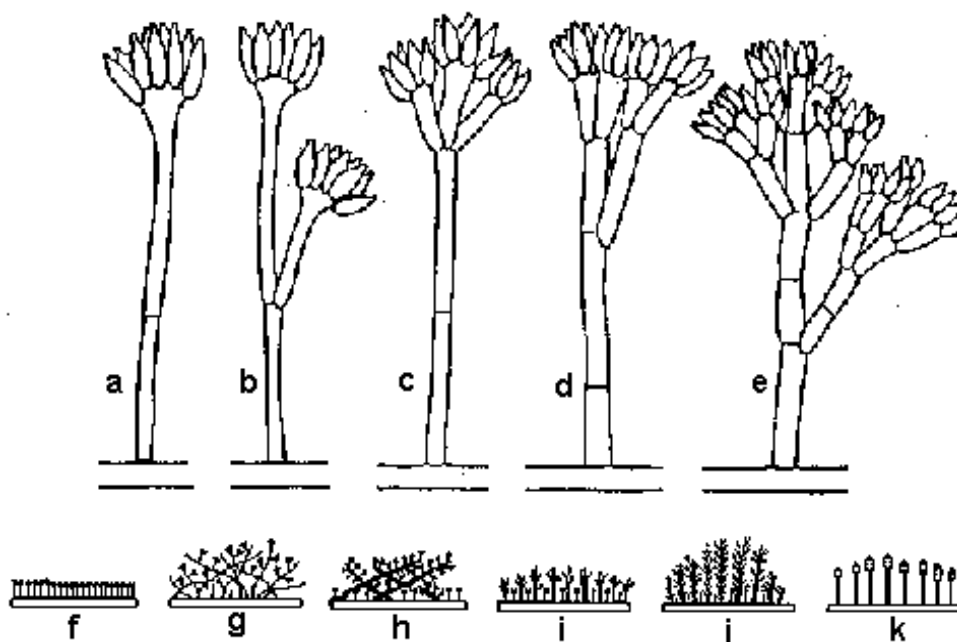


Figura 4- “a – e”, tipos de ramificações do conidióforo: a e b, simples; c, biverticilado; d, triverticilado; e, quaternário. “f – k”, tipos de colônias: f, aveludada; g, algodonosa; h, funicular; i - k, fasciculada.

Fonte: SAMSON et al. (2000).

Cor dos conídios e do micélio. As colônias são inicialmente brancas e transforma-se em verde azul, verde cinzento, cinza verde-oliva, amarelo ou roseadas conforme os conídios vão sendo produzidos.

Produção de pigmentos solúveis e/ou exsudatos. A produção de pigmento que se difunde no meio de cultivo é uma característica útil para classificação, entretanto este mecanismo está sob regulação genética então podem ou não ser expressos. Isso deve ser enfatizado, pois o fato de determinada cepa não apresentar pigmentação não deve ser encarado de forma negativa para sua caracterização na espécie. Com relação a produção de exsudatos, algumas espécies são capazes de liberar gotículas a partir do micélio, especialmente quando crescem sobre o meio agar Czapek extrato de levedura. Esta é uma característica marcante para algumas espécies; a cor e extensão da produção deste exsudato são ferramentas taxonômicas importantes. (Figura 5)

Formação de esclerócios. Sua presença, tamanho e cor são de importância diagnóstica (Figura 5).

Produção de gimnotécios ou cleistotécios. Estruturas grandes características da reprodução sexual dos fungos as quais vão conter os ascos com os ascosporos em seu interior. O que diferencia estes dois tipos é: os cleistotécios são formados por um corpo esférico de paredes lisas e os gimnotécios formados por paredes de hifas.

As características microscópicas mais importantes do ponto de vista taxonômico são:

Conidióforo. Consiste de uma estipe distinta que culmina em um pincel; são hialinos, com hifas septadas, são simples ou ramificados. E isto irá determinar a divisão taxonômica primária deste gênero em quatro subgêneros: *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Biverticillium* e *Penicillium*.

Tipo de pincel. As fiálides podem ser produzidas individualmente, em grupos ou ramificadas em métulas, formando um pincel. Podendo ser então: monoverticilados, biverticilados, terverticilados e/ou quaterverticilados (Figura 4).

Número e disposição das métulas por estipe. O número irá variar segundo a complexidade do pincel. Quando a disposição é irregular, de forma lateral e terminal sobre a estipe estamos dentro do subgênero *Furcatum*, seção *Divaricatum*. E quando a disposição é regular, de forma terminal sobre a estipe, estamos dentro do subgênero *Furcatum*, seção *Furcatum*.

Forma das fiálides. Existem dois tipos: ampuliformes e acerosas. As ampuliformes são semelhantes a garrafas e as acerosas são semelhantes a agulhas de pinheiro, com lados paralelos que convergem numa forma cônica para um orifício estreito.

Tamanho relativo entre fiálides e métulas. A relação entre o tamanho destas duas estruturas, juntamente com a taxa de crescimento no meio agar nitrato glicerol a 25%, é de fundamental importância na separação nos subgêneros *Furcatum* e *Biverticillium*.

Tamanho e textura da estipe, que pode ser lisa ou rugosa.

Diâmetro, textura e tamanho dos conídios.

Forma, ornamentação e tamanho dos ascos e ascosporos.



Figura 5- A-B colônia aveludada. B típico exsudato amarelo. C colônia aveludada que está se tornando fasciculada com o tempo. D grandes e compactas cabeças conidiais. E colônia flocosa. F esclerócios. G-I colônias fasciculadas. J blocos de massas conidiais em colônia de 10 dias de idade. K-L colônia sinemmata.

Fonte: FRISVAD; SAMSON (2004)

Um problema importante quando se quer estabelecer a ocorrência de *Penicillium* é que na maioria dos casos não se realiza a identificação em nível de espécies devido a sua complexidade (Figura 6).

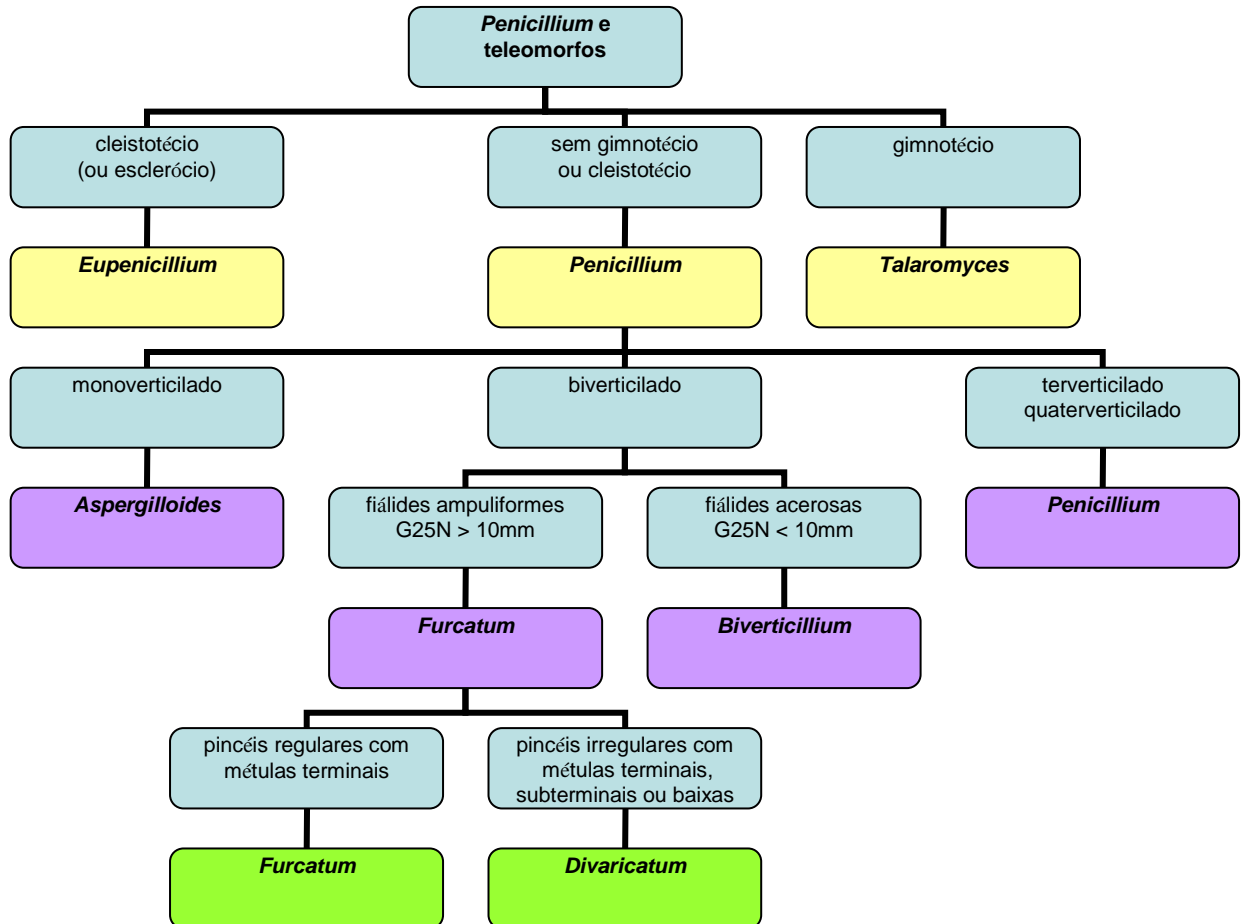


Figura 6- Chave taxonômica básica para o gênero *Penicillium* e seus teleomorfos.

Preenchimento em amarelo para gêneros; roxo para subgêneros e verde para seções. G25N refere-se ao meio de cultivo agar nitrato glicerol a 25%.

Fonte: PITT (1988).

Diversas espécies de *Penicillium* são reconhecidas como capazes de produzir metabólitos tóxicos, porém as micotoxinas mais importantes encontradas em alimentos são: ocratoxina A (OTA), patulina, citrinina e citreoviridina (Tabela 2).

Tabela 2- Potencial toxígeno das principais espécies de *Penicillium* que contaminam produtos vegetais.

Espécies de <i>Penicillium</i>	Micotoxinas
<i>P. aethiopicum</i>	Griseofulvina, Viridicatumtoxina
<i>P. aurantiogriseum</i>	Ácido Penicílico, Roquefortina C, Xantomegnina, Viomeleim, Verrucosidina
<i>P. brevicompactum</i>	Ácido Micofenólico
<i>P. camemberti</i>	Ácido Ciclopiazônico
<i>P. chrysogenum</i>	Roquefortina C, Ácido Ciclopiazônico
<i>P. citreonigrum</i>	Citreoviridina
<i>P. citrinum</i>	Citrinina
<i>P. commune</i>	Ácido Ciclopiazônico, Ácido Ciclopáldico, Ácido Ciclopólico, Ciclopiamina, Palitantina, Rugulovasinas
<i>P. crustosum</i>	Penitrem A
<i>P. expansum</i>	Patulina, Citrinina
<i>P. funiculosum</i>	Patulina
<i>P. griseofulvum</i>	Patulina, Ácido Ciclopiazônico, Roquefortina C, Griseofulvina
<i>P. hirsutum</i>	Roquefortina C, Ácido Ciclopiazônico
<i>P. islandicum</i>	Cicloclorotina, Islanditoxina, Leuteoskyrina, Eritroskyrina
<i>P. janczewskii</i>	Griseofulvina, Penitrem A
<i>P. janthinellum</i>	Toxinas Tremorgênicas
<i>P. oxalicum</i>	Ácido Secalônico D
<i>P. paxilli</i>	Verruculogem, Paxiline (Toxinas Tremorgênicas)
<i>P. purpurogenum</i>	Rubratoxinas
<i>P. raistrickii</i>	Griseofulvina, Toxinas Tremorgênicas
<i>P. roqueforti</i>	PR Toxina, Patulina, Ácido Penicílico, Roquefortina C, Ácido Micofenólico
<i>P. rugulosum</i>	Rugulosina
<i>P. simplicissimum</i>	Verruculogem, Fumitremorgem B, Ácido Penicílico, Viridicatumtoxina
<i>P. variabile</i>	Rugulosina
<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina A, Citrinina
<i>P. viridicatum</i>	Xantomegnina, Viomeleim, Vioxantina

Fonte: PITT; HOCKING (1997).

2.2.3- Gênero *Fusarium*

Dentre os fungos filamentosos contaminantes de alimentos de maior importância encontramos, juntamente com *Aspergillus* e *Penicillium*, o gênero *Fusarium* (SIDHU, 2002). Espécies desse gênero encontram-se amplamente distribuídas em plantas e no solo, sendo um importante fitopatógeno. É encontrado na micoflora de produtos como arroz, feijão, soja, milho, dentre outros grãos. Enquanto as espécies mais comuns são encontradas em áreas tropicais e subtropicais, outras têm predileção por clima mais frio, habitando o solo dessas regiões.

Apesar de ser importante fitopatógeno e contaminante, espécies deste gênero podem causar diversas infecções em humanos, conhecidas como fusarioses, exemplo disso são algumas micoses oportunistas. A espécie mais virulenta é o *F. solani*, que frequentemente promove infecções cutâneas em traumas na pele. Já as infecções disseminadas costumam ocorrer em imunossuprimidos, pacientes com neutropenia e em transplantados.

Tem-se constituindo esse gênero cerca de vinte espécies, distribuídas em 12 seções. Podem-se citar como espécies mais comuns o *F. solani*, *F. oxysporum* e *F. chlamydosporum*. A seção Liseola é a mais importante, pois contém espécies potencialmente produtoras das micotoxinas mais comuns, como o *F. verticillioides* e *F. graminearum*; a ingestão de grãos contaminados com tais toxinas pode levar a ocorrência de sintomas alérgicos ou carcinogênese se houver consumo prolongado.

São aspectos macroscópicos desse grupo de fungos o crescimento de colônias algodonosas a lanosas, planas e de crescimento vasto. A coloração da colônia varia de branco, creme, bronze, salmão, avermelhada, amarelada, ao violeta, rosa ou roxo. E o reverso pode ser sem cor, bronze, vermelho, roxo ou amarronzado.

Podem apresentar esporodóquios, que são um conjunto de hifas com conidióforos na superfície, e podem ser observados nas cores creme ao bronze ou alaranjado, exceto a espécie *F. solani* que produz esporodóquios de cor azul ou azul-esverdeado.

Possuem características microscópicas bem distintas; apresentam hifas septadas, conidióforos, fiálides, macroconídios e microconídios (Figura 7). Em adição, clamidosporos podem ser produzidos por várias espécies (Figura 8).

As fiálides são cilíndricas com um pequeno colarete, únicas ou são produzidas como um complexo sistema de ramos, as monofiálides ou polifiálides.

Os macroconídios são produzidos a partir de fiálides em conidióforos ramificados ou não ramificados. Possuem dois ou mais septos, de paredes finas, lisas e em formato cilíndrico. Podem possuir uma célula basal distinta em formato de pé.

Já os microconídios são formados em conidióforos únicos longos ou curtos. Possuem um septo ou ocasionalmente de 2 a 3 septos. São lisos, hialinos, ovóides, cilíndricos, piriformes, etc...; arrançados em falsas cabeças ou falsas cabeças e conídios em cadeia (Figura 8).

Clamidosporos, quando presentes, são encontrados soltos, em pares ou em cadeias. Tem a parede lisa ou rugosa, hialina, sendo intercalados ou terminais.

Todos esses achados macroscópicos e microscópicos são pontos chaves para se identificar as espécies de *Fusarium*.

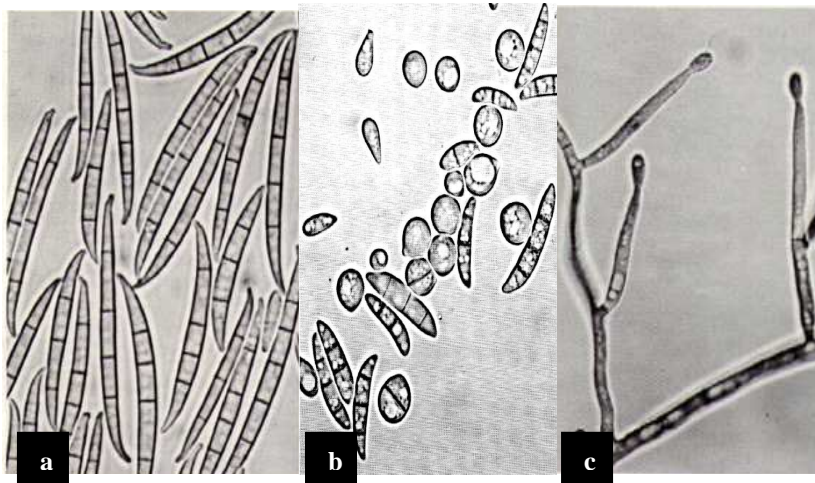


Figura 7- a, Macroconídios; b, Microconídios; c, Monofiálides.

Fonte: NELSON; TOUSSOUN; MARASAS (1983).

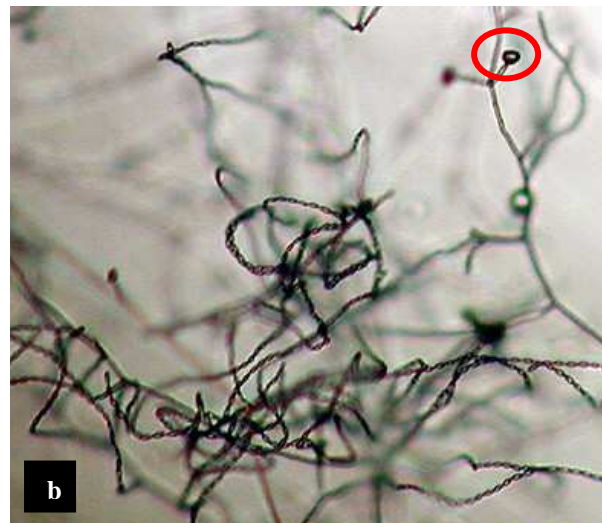
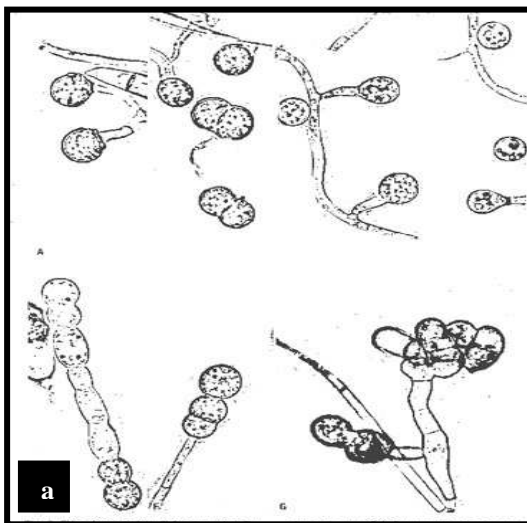


Figura 8- a, Disposição de clamidosporos; b, Conídios em cadeia e falsa cabeça (círculo vermelho).

Fonte: NELSON; TOUSSOUN; MARASAS (1983); DRAF (2008).

Dentre as toxinas produzidas por *Fusarium*, as mais importantes são: fumonisinas, zearalenona e tricotecenos (Tabela 3). Os tricotecenos formam um grupo de mais de 50 compostos relacionados e que têm como núcleo químico básico os 12,13-epoxitricotecenos. Dentre estas substâncias, ressaltamos a T-2 toxina, diacetoxiscirpenol (DAS), neosolaniol, nivalenol, diacetilnivalenol, deoxinivalenol (DON), HT-2 toxina, fusarenona X e a roridina.

Tabela 3- Potencial toxígeno das principais espécies de *Fusarium* que contaminam produtos vegetais.

Espécies de <i>Fusarium</i>^a	Micotoxinas
<i>F. acuminatum</i>	T-2 toxina, Moniliformina, HT-2 Toxina, Diacetoxiscirpenol, Monoacetoxiscirpenol, Neosolaniol, Beauvericina
<i>F. anthophilum</i>	Beauvericina
<i>F. avenaceum</i>	Moniliformina, Beauvericina
<i>F. cerealis</i>	Nivalenol, Fusarenona-X (4-Acetil-NIV), Zearalenona, Zearalenoles (α e β isômeros)
<i>F. chlamydosporum</i>	Moniliformina
<i>F. culmorum</i>	Deoxinivalenol (Vomitoxina), Zearalenona, Nivalenol, Fusarenona-X (4-Acetil-NIV), Zearalenoles (α e β isômeros), Mono-acetildeoxinivalenol (3-AcDON, 15-AcDON)
<i>F. equiseti</i>	Zearalenona, Zearalenoles (α e β isômeros), Monoacetoxiscirpenol, Diacetoxiscirpenol, Nivalenol, Diacetilnivalenol, Fusarenona-X (4-Acetil-NIV), Fusarocromanona, Beauvericina
<i>F. graminearum</i>	Deoxinivalenol (Vomitoxina), Zearalenona, Nivalenol, Fusarenona-X (4-Acetil-NIV), Mono-acetildeoxinivalenol (3-AcDON, 15-AcDON), Di-acetildeoxinivalenol, Diacetilnivalenol
<i>F. heterosporum</i>	Zearalenona, Zearalenoles (α e β isômeros)
<i>F. nygamai</i>	Beauvericina, Fumonisina B ₁ , Fumonisina B ₂
<i>F. oxysporum</i>	Moniliformina, Beauvericina
<i>F. poae</i>	Diacetoxiscirpenol, Nivalenol, Fusarenona-X (4-Acetil-NIV), Monoacetoxiscirpenol, T-2 toxina, HT-2 Toxina, Neosolaniol, Beauvericina
<i>F. proliferatum</i>	Fumonisina B ₁ , Beauvericina, Moniliformina, Fusaproliferina, Fumonisina B ₂
<i>F. sambucinum</i>	Diacetoxiscirpenol, T-2 toxina, Neosolaniol, Zearalenona, Monoacetoxiscirpenol, Beauvericina
<i>F. semitectum</i>	Zearalenona, Beauvericina
<i>F. sporotrichioides</i>	T-2 toxina, HT-2 Toxina, Neosolaniol, Monoacetoxiscirpenol, Diacetoxiscirpenol
<i>F. subglutinans</i>	Beauvericina, Moniliformina, Fusaproliferina
<i>F. tricinctum</i>	Moniliformina, Beauvericina
<i>F. verticillioides</i>	Fumonisina B ₁ , Fumonisina B ₂ , Fumonisina B ₃

Fonte: LOGRIECO et al. (2002).

^a Nomenclatura de *Fusarium* de acordo com NELSON; TOUSSOUN; MARASAS (1983).

2.4- Micotoxinas e micotoxicoses: características gerais

As micotoxinas têm 100 vezes mais potencial carcinogênico relativo do que as outras categorias de substâncias encontradas em dietas como: as sintéticas (pesticidas e aditivos); condimentos e compostos formados durante o cozimento de alimentos (aminas heterocíclicas, benzopirenos e etc..) (MILLER, 1996).

Estas toxinas ocorrem em uma ampla variedade de substratos e têm sido implicadas em uma série de patologias humanas e animais (RINALDI, 1983; CAST, 2003; DILKIN; MALLMANN, 2004; MORGAVY; RILEY, 2007). Entretanto o que preocupa, não é a ocorrência em altos níveis, mas a ocorrência destes produtos do metabolismo fúngico em pequenas quantidades em produtos vegetais básicos e seus subprodutos industrializados. A ingestão diária e constante de pequenas quantidades destes compostos através de alimentos essenciais, sem dúvida, terá papel importante na indução ou modulação de patologias no homem e nos animais e justifica estudos interdisciplinares com a finalidade de melhorar o diagnóstico e as medidas preventivas.

Quando as toxinas fúngicas são ingeridas ou inaladas em determinadas concentrações pelos animais ou pelo homem produzem um quadro clínico-patológico conhecido como micotoxicoses. Estas podem ser definidas como primárias ou secundárias de acordo com a forma de sua entrada no organismo. A primária ocorre com o consumo direto dos produtos contaminados, e a secundária ocorre ao se ingerir leite, carne ou derivados de animais que foram alimentados com forragem contaminada. As características de uma micotoxicose são: enfermidade não contagiosa; o tratamento com drogas produz pouco ou nenhum efeito; o problema é estacional devido as condições climáticas que afetam o desenvolvimento fúngico; o surto está comumente associado com um alimento ou forragem específico, onde o exame do material suspeito revela sinais de atividade fúngica (LILLEHOJ, 1991).

As alterações associadas com as micotoxicoses são: reações alérgicas, imunossupressão, quadros nervosos e hemorrágicos, diminuição da eficiência produtiva e reprodutiva, deficiências metabólicas e bioquímicas, gastroenterites, enfermidades autoimunes, deficiências em vitaminas e/ou minerais, alterações genéticas, teratogênicas, carcinogênicas, incluso a morte em alguns casos (CAST, 2003; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

A ocorrência de micotoxicoses entre os animais domésticos é reflexo do sistema produtivo adotado pelos criadores. Quanto mais evoluído for, maior será a utilização de alimentos concentrados, a base de grãos, tornando maior a probabilidade de intoxicação pelas micotoxinas (ROSA, 2002).

2.5- Aflatoxinas

As aflatoxinas são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. A AFB₁, mais freqüente e mais tóxica, é reconhecida como o mais potente hepatocarcinógeno de origem biológica para o homem e os animais (IARC, 1993). Estas toxinas são encontradas como contaminantes naturais de cereais e rações e em baixas concentrações produzem alterações sobre o metabolismo, provocando lentamente sérios danos à saúde e produtividade do animal. Os efeitos mais freqüentemente observados são a diminuição da velocidade de crescimento e da eficiência alimentar, causados pela redução do metabolismo protéico e absorção de gorduras e a supressão da resposta imune. Os grãos estocados inadequadamente, com umidade e temperatura acima de 14% e 20%, respectivamente, podem potencialmente serem colonizados.

Produtos de origem animal podem apresentar teores residuais de aflatoxinas biotransformadas através do sistema misto oxidase hepático do animal que as ingeriu, tais como a aflatoxina M₁ (AFM₁), o aflatoxicol (AFL), a AFB₂, além da própria AFB₁. Estas substâncias têm sido detectadas em leite e derivados; ovos e derivados; fígado, músculo e derivados cárneos.

Casos suspeitos de aflatoxicose equina aguda já foram descritos causando necrose hepática centrolobular com extensa hemorragia cardíaca e gastrointestinal, porém não se tem determinada a LD₅₀ (dose letal para 50% dos indivíduos) e não há sinais patognomônicos ou lesões típicas associadas com esta espécie. (ALLER; EDDS; ASQUITH, 1981). Os sinais clínicos observados incluem depressão do sistema nervoso central, anorexia, perda de peso, icterícia e hemorragias subcutâneas (GREENE; OEHME, 1975; ASQUITH; EDDS, 1980). A necropsia evidenciou fígado gordo e frágil, rins friáveis e pálidos, petéquias epi e endocardiais, miocárdio pálido, enterites hemorrágicas, hiperplasia de dutos biliares e edema cerebral. A concentração de AFB₁ em rações analisadas nestes episódios variou de 216 a 940 ppb (partes por bilhão, equivalente a µg/kg), enquanto que a concentração foi de 6500 ppb de AFB₁ no amendoim utilizado como matéria-prima (ANGSUBHAKORN et al., 1981).

O aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado tem alta afinidade pela aflatoxina e podem adsorvê-la, reduzindo sua absorção do trato gastrointestinal. Vitamina E e selênio suplementares também têm sido usados com sucesso apenas parcial.

A legislação brasileira (MAPA, 1988) admite um nível de contaminação máximo por aflatoxinas totais equivalente a 50 ppb; válido para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente em rações destinadas ao consumo animal. Cerca de 1% da AFB₁ ingerida na alimentação animal irá aparecer excretada no leite na forma de AFM₁, que é seu metabólito hidroxilado. Por conta disso, houve um aumento expressivo de países que criaram regulamentação específica para estas micotoxinas. Porém as leis referem-se especificamente aos ruminantes; será que este mesmo mecanismo não ocorre, por exemplo, com o leite de éguas que pode ser utilizado pelas pessoas que apresentam intolerância à lactose bovina? E neste caso, o limite aceito pela comunidade européia é de cinco ppb na alimentação animal e correspondentemente 0,05 ppb no leite. Vale ressaltar que mesmo se desconsiderarmos este fato, o limite estabelecido pela comunidade européia para rações animais é de 20 ppb (GMP, 2008), menos da metade limite praticado em nosso país.

2.6- Fumonisinias

As micotoxicoses em eqüinos estão relacionadas principalmente com a ingestão de rações a base de milho contaminado por fumonisinias, toxinas produzidas por fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*, sendo *F. verticillioides* o maior produtor. Estas micotoxinas foram descobertas recentemente, e já foram identificados seis tipos sendo a FB₁ a mais comum e mais tóxica. Este grupo de toxinas é responsável por lesões hepáticas e a FB₁ é causadora da leucoencefalomalácia eqüina (LEME),

A LEME é uma doença não infecciosa esporádica e altamente fatal que afeta o sistema nervoso central de cavalos e outros eqüídeos. Foi descrita no início do século XX por Bucley; McCallum (1901) e caracterizada por encefalite hemorrágica aguda acometendo os eqüinos de Maryland (EUA). Butler (1902) foi quem confirmou experimentalmente a doença, após a administração oral de milho mofado a eqüinos. Wilson; Maranpot (1971) conseguiram reproduzir experimentalmente a doença através da administração oral à eqüinos de milho contaminado artificialmente com *F. verticillioides*, isolados de cereal envolvido com surto da doença no Egito.

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez em São Paulo por Rego (1950), entretanto a relação entre LEME e o fungo só foi estabelecida por Riet-Correa et al. (1982) quando da descrição de três surtos da toxicose no Rio Grande do Sul. Em 1988, após a descoberta das fumonisinias, realizada por Gelderblom et al. (1988), Marasas et al. (1988) conseguiu reproduzir experimentalmente a LEME em eqüino que recebeu 0,125mg/kg de peso vivo (PV) de FB₁ purificada por via endovenosa durante nove dias (dose total: 276mg). Os sinais clínicos da micotoxicose tornaram-se aparentes no 8^o dia após a inoculação e consistiam de apatia, tremores musculares, paresia do lábio inferior e língua, convulsões tetânicas e morte. À necropsia, foram observados edema cerebral acentuado e necrose focal bilateral da medula oblonga. As alterações bioquímicas observadas no soro sangüíneo foram pequena elevação das enzimas aspartato transferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT). A confirmação do papel da FB₁ pura na apresentação dos sintomas foi realizada por Kellerman et al. (1990). Neste trabalho, os autores induziram LEME através da administração oral de FB₁ a dois eqüinos, sendo que um deles recebeu FB₁ (50% de pureza) em 21 doses de 1,25mg a 4mg/kg /PV durante período de 33 dias (dose total de 8,925g) e o outro animal recebeu 1 a 4mg/kg/PV de FB₁ pura durante 24 dias (dose total de 8,417g). Entre o 24^o e o 30^o dias após a dosificação oral, os animais desenvolveram sinais neurotóxicos que incluíam alterações no comportamento, incoordenação, paralisia dos lábios e língua e tremores musculares. Após a eutanásia, realizada no início do aparecimento dos sinais, os autores observaram lesões típicas da doença com a presença de necrose cavitária ou amolecimento da substância branca de ambos hemisférios cerebrais.

Wilson et al. (1990) avaliaram a toxicidade *in vivo* de alimentos de eqüinos provenientes de diferentes haras, e semelhante a ROSS et al. (1991) detectaram níveis entre 1 ppm e 126 ppm de fumonisina B₁ em alimentos balanceados de eqüinos associados com LEME. Vesonder; Haliburton; Golinsky (1989) associaram a LEME com a presença de *F. verticillioides* em amostras de alimento balanceado, milho e aveia, semelhante aos resultados obtidos por Sydenham et al. (1992) que relacionaram a contaminação de rações por com fumonisinias com surtos de micotoxicoses nos animais.

Diversas micotoxinas de *Fusarium* podem co-ocorrer em um ingrediente particular ou em rações comerciais. Em geral, combinações de toxinas deste gênero resultam em efeitos aditivos; interações de sinergismo e/ou potencialização e representam grande preocupação para a saúde e produtividade dos animais domésticos (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999).

Com relação aos limites máximos admissíveis para esta classe de micotoxinas, podemos dizer que praticamente não há regulamentação específica, talvez justificada por sua descoberta tardia. Em Junho de 2000, o FDA (*Food and Drug Administration*) estabelecia como normativa o limite de cinco ppm de fumonisinas na alimentação de eqüídeos sem, contudo, ultrapassar 20% do peso da dieta seca. Posteriormente, estudo realizado pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* mostrava que apenas seis países no mundo inteiro já haviam fixado seus valores limites (FAO, 2003), sendo: 4 países = 1000 ppb ou 1 ppm (equivalente a 1 µg/g); 1 país = 2 ppm; e 1 país = 3ppm. No Brasil ainda não há legislação específica apesar da importância destas micotoxinas no cultivo do milho.

2.6.1. Modo de atuação das fumonisinas

O modo de atuação das fumonisinas ainda não é perfeitamente conhecido, mas Wang et al. (1991), propuseram que a FB₁ poderia intervir na biossíntese de esfingolipídios ou *turnover* de esfingosina, pois existe uma similaridade desta com a molécula de FB₁ (Figura 9). A inibição de biossíntese dos esfingolipídios pode ter um profundo efeito sobre a célula, uma vez que esses componentes têm papel importante na estrutura da membrana, comunicação celular, interação intracelular e matriz celular, regulação de fatores de crescimento, como mensageiro de vários fatores, incluindo fator de necrose de tumor, interleucina₁ e fator de crescimento de nervos.

A inibição desta via metabólica resulta na depleção do complexo esfingolipídio, aumento intracelular da concentração de esfinganina livre, ou em menor grau de esfingosina livre, e um aumento dos produtos de clivagem. O acúmulo das bases esfingóides é a causa primária da toxicidade das fumonisinas. A alteração no metabolismo dos esfingolipídios pode ser monitorada, já que alguma esfinganina que acumula na célula pode aparecer no sangue periférico. Wang et al. (1992) alimentaram pôneis com dietas contendo 44µg/g de FB₁ durante 10 dias e observaram, no vigésimo dia do experimento, elevação no nível de esfinganina, cerca de 2,7 vezes. As elevações das enzimas séricas ocorreram somente após 10 dias, indicando que os níveis de esfinganina e esfingosina podem ser utilizados como marcadores de exposição animal as fumonisinas.

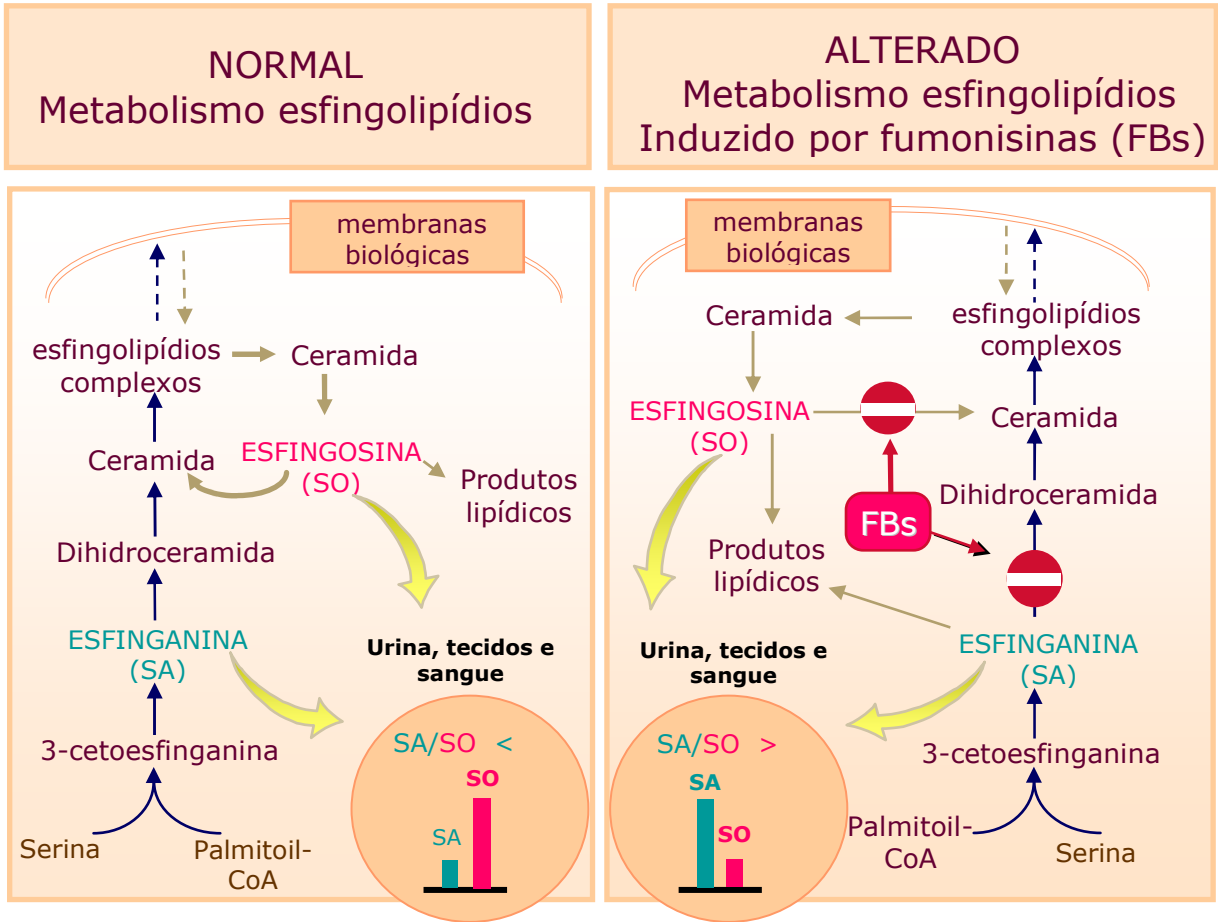


Figura 9- Esquema do provável modo de atuação das fumonisinas.

2.7- Outras micotoxinas de importância para os eqüinos

2.7.1 Ocratoxina A

As ocratoxinas são produzidas por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, principalmente por *P. verrucosum* e *A. ochraceus*. O *P. verrucosum* é muito encontrado como contaminante de cereais em regiões de clima temperado, mas também está significativamente presente em carnes refrigeradas nas regiões subtropicais. Existem sete tipos de ocratoxinas, sendo as mais importantes as do tipo “A”, tipo “B” e tipo “C”. A ocratoxina A (OTA) é a mais abundante e mais tóxica deste grupo, podendo desencadear inúmeros efeitos tóxicos em aves e mamíferos, como teratogênese, carcinogênese, imunossupressão e principalmente nefrotoxicidade. A nefropatia micotóxica é uma doença fatal, que clinicamente se apresenta com falhas renais progressivas, acompanhada por anemia (supressão da hematopoiese), sem hipertensão e depressão. Morfológicamente causa atrofia dos túbulos proximais renais, fibrose cortical, assim sendo, pelo impedimento da função tubular, ocasiona-se oligúria. Com a ingestão continuada, podem surgir neoplasias no trato urinário, como tumores bilaterais, pélvicos ou uretrais, de progressão lenta, e microcistos renais; além dos efeitos imunossupressor sobre o timo, baço e linfonodos, embriotoxicidade e teratogenia.

2.7.2 Citrinina

É uma importante micotoxina nefrotóxica para o homem, bovinos, eqüinos, cães, e principalmente para suínos e aves. É produzida por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, destacando-se entre estes, o *A. niveus*, *A. terreus*, *P. citrinum*, *P. verrucosum* e *P. viridicatum*. Fungos citrinogênicos têm sido isolados de amendoim, arroz, aveia, centeio, cevada, milho, trigo e ração. A citrinina, assim como a OTA, está relacionada com a ocorrência da nefropatia micotóxica na ingestão de cereais mofados, a qual foi também diagnosticada no Brasil, em animais que se alimentavam com cevada fermentada de cervejaria. Esta micotoxicose caracteriza-se por ser de caráter crônico com baixa mortalidade, causando lesões de caráter hemorrágico, alterações séricas, necrose hepática e renal, com fibrose intersticial, e cardiotoxicidade. Tanto nos casos de intoxicação por ocratoxinas quanto por citrinina, o uso de carvão ativado reduz a absorção destas em nível gastrointestinal, mas usualmente não é prático para os casos de exposição crônica. Devido ao fato dos animais sobreviventes ou convalescentes sofrerem de insuficiência renal crônica, a ingestão de proteínas deve ser limitada, além de ser necessário um tratamento de apoio adequado, o que implica em gastos e queda de performance.

2.7.3 Eslaframina

É um alcalóide indolizidínico, produzida pelo fungo *Rhizoctonia leguminicola* que infesta o trevo vermelho e, ocasionalmente, outras leguminosas. Tem sua produção favorecida no frio e com tempo úmido, especialmente durante o período de recrescimento das forrageiras. Apresenta propriedades parassimpatomiméticas e imita a ação da acetilcolina, ligando-se aos seus receptores. Os eqüinos são altamente susceptíveis e os sinais clínicos desenvolvem-se rapidamente, muitas vezes dentro de 1-3 horas após o consumo de forrageiras contaminadas. Salivação profusa é uma resposta clínica característica, sendo também observados lacrimejamento moderado, micção freqüente, diarreia, timpanismo, rigidez e interrupção da produção de leite. A atropina pode ser usada no tratamento sintomático da salivação e diarreia, e são necessários observação e cuidados de apoio geral para a desidratação e a dificuldade respiratória.

2.7.4 Toxinas tremorgênicas

Tremórgenos são um grupo de toxinas produzidas por diferentes fungos: o fungo endofítico *Acremonium lolii*, que produz o lolitreto B e comumente infecta o azevém, produzindo o quadro conhecido como cambaleio por azevém. O *Claviceps paspali* é um ergot de cor pálida, globóide e rugoso que produz paspalitreto A e B, paspalanina e ácido lisérgico e parasita o paspalum. *P. crustosum*, *P. cyclopium*, *P. palitan* e *P. puberulum* produzem penitreto A. Estas micotoxinas são caracterizadas por uma molécula de indol, que é parte de uma estrutura anelar complexa que inclui o ácido lisérgico. Os derivados do ácido lisérgico estão associados com a redução da concentração ou da função dos aminoácidos inibitórios (GABA e glicina), podendo ocorrer aumento da liberação de neurotransmissores e despolarização prolongada, e facilitação da transmissão sináptica no final da placa motora. Um segundo mecanismo potencial é a vasoconstrição dos vasos cerebrais o que pode levar a anóxia cerebral. Os efeitos observados incluem tremores leves de cabeça e pescoço, rigidez, ataxia, hipermetria, opistótonos e convulsões. Alguns animais podem tornar-se hostis ferindo-se a si próprios ou a outros. A morbidade é tipicamente alta, mas a mortalidade é baixa. Carvão vegetal ativado e catárticos salinos são úteis para a descontaminação por via oral. Medicamentos que aumentam a concentração de glicina (p.ex. mefenesina e nalorfina) no sistema nervoso central podem reduzir os efeitos dessas micotoxinas.

2.7.5 Tricotecenos

Dentre estas substâncias, ressaltamos a T-2 toxina, o DON, o DAS e o nivalenol, importantes por estarem relacionadas com diversas patologias animais. Os sintomas mais comuns relacionados com este tipo de intoxicação incluem perda de peso e redução na conversão alimentar, êmese, recusa de alimentos, diarréia sanguinolenta, hemorragias, aborto, distúrbios nervosos, além de inibirem a síntese de ácido nucléico e proteína. Também são facilmente absorvidos pela pele, podendo causar irritação local, inflamação, descamação, hemorragia subepitelial e necrose.

2.7.6 Zearalenona

A zearalenona (ZEA) ou toxina F-2 é produzida principalmente por *F. roseum* e *F. graminearum*, e apresenta atividade estrogênica quando consumida através de ração contaminada, em particular nos períodos frios, onde há oscilação de temperatura. Seus efeitos estrogênicos são claramente observados nos suínos, pois são mais susceptíveis, sendo os efeitos mais pronunciados nas fêmeas. Representados clinicamente nas fêmeas por infertilidade, falso cio, diminuição da ovulação, fetos poucos desenvolvidos, tumefação vulvar, aumento e prolapso do útero e reto e aumento das glândulas mamárias nas fêmeas imaturas. Nos machos, apresentam-se atrofia testicular, infertilidade e aumento das glândulas mamárias. O carvão ativado liga-se à ZEA no trato gastrointestinal e ajuda a prevenir o ciclo êntero-hepático. A adição da argila bentonita em dietas contaminadas é considerada útil no controle dos efeitos tóxicos.

2.7.7 Rubratoxinas

Certas espécies do gênero *Penicillium*, em especial *Penicillium rubrum*, são importantes por produzirem rubratoxinas, as quais podem potencializar as ações das aflatoxinas. Uma exposição crônica as rubratoxinas produz extensos danos nos tecidos vivos que consiste basicamente de necrose hemorrágica.

2.8- Métodos de detecção das micotoxinas

O TLC é um dos métodos mais antigos e continua a ser utilizado como método oficial de análise para algumas micotoxinas (SCOTT, 1990). É econômica, rápida e prática especialmente quando se necessita analisar muitas amostras, havendo a possibilidade de fazer uma detecção multitoxinas. O inconveniente desta técnica é, muitas vezes, o seu limite de detecção; não conseguindo demonstrar níveis muito baixos de toxinas. Vem sendo utilizada como método de triagem.

O HPLC é o método mais freqüente e amplamente utilizado, sendo inclusive adotado como método oficial para análise de várias micotoxinas (TRUCKSESS, 2006). É uma técnica cara e demorada especialmente na análise de várias micotoxinas, que devem ser quantificadas em separado; as concentrações mínimas detectáveis em geral são bem baixas; o sistema de quantificação com detector de fluorescência proporciona resultados mais exatos e com menor variabilidade.

Os métodos imunológicos têm sido largamente utilizados devido à sua sensibilidade, especificidade, rapidez, simplicidade e baixo custo. Utilizam anticorpos específicos para isolar e/ou detectar as micotoxinas nos alimentos. A base destes métodos é a interação entre antígenos (toxinas fúngicas) e anticorpos específicos, produzidos num organismo animal, geralmente o coelho, pelos linfócitos B. Entre os métodos imunológicos utilizados na dosagem das micotoxinas os mais comuns são o ELISA, aprovado como método oficial da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para triagem de aflatoxinas, RIA (*radio-immuno-assay*) e IAC. As duas técnicas, RIA e ELISA, são baseadas na competição de ligação entre a toxina não marcada proveniente da amostra e a marcada sobre os locais específicos do anticorpo; a IAC é uma técnica cromatográfica baseada diretamente na ligação antígeno (toxina) com o anticorpo fixado numa coluna.

Os inferiores limites de detecção que se conseguem com o ELISA em detrimento do RIA, e a complexidade do equipamento indispensável para a aplicação do método RIA, para além do inconveniente que envolve o trabalho com material radioativo, levou à utilização do ELISA e IAC, até porque existem *kits* de aplicação que permitem a sua utilização rápida por uma pessoa não especializada em técnicas imunológicas. A IAC, em que as colunas contêm anticorpos seletivos imobilizados, tornou-se um método muito válido pois "com as colunas de imunoafinidade o procedimento para o pré-tratamento da amostra total é reduzido a uma única extração em fase sólida" (MORTIMER et al., 1987).

2.9- Estudos preliminares

Estudos prévios permitiram aportar os primeiros dados sobre a frequência de toxinas e de fungos toxígenos em alimentos destinados ao consumo de eqüinos nas cidades do Rio de Janeiro e de Seropédica (KELLER et al., 2007). Os autores observaram que a maioria dos alimentos avaliados apresentou valores de contagens da carga fúngica superiores aos limites recomendados (GMP, 2008). O gênero *Aspergillus* foi o mais freqüente, tendo o *A. flavus* como espécie predominante. Os níveis de contaminação por AFB₁ estiveram entre 0,01 e 99,4 µg/g, e para FB₁ os valores foram desde 0,01 até 7,49 mg/g.

Ao buscarmos na literatura mundial estudos similares à este proposto nos deparamos com uma enorme lacuna; as investigações realizadas especificamente na espécie eqüina são muito antigas, a maioria das vezes através de infecção experimental. Os dados mais recentes referem-se à avaliação de surtos esporádicos, onde o alimento suspeito era então analisado. Reveste, portanto de grande importância o monitoramento micotoxicológico rotineiro, para que possa ser feita uma avaliação de risco e assim **prevenir** o surgimento da doença.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Um total de 60 amostras representativas de alimentos fornecidos à equinos foram coletadas de diferentes estabelecimentos hípicas, localizados nas cidades do Rio de Janeiro e Seropédica, escolhidos por conveniência de facilidade para obtenção das amostras. O período total de coletas foi compreendido entre Junho de 2003 a Junho de 2006.

Dentre as amostras coletadas temos: alimentos balanceados completos dos principais fabricantes e marcas comerciais à disposição no mercado nacional brasileiro; alimentos balanceados completos fabricados no próprio estabelecimento (“ração batida”); e amostras de aveia laminada achatada que pode ser utilizada como única fonte de carboidratos da dieta ou como suplemento em programas nutricionais para cavalos de alta performance.

Quanto aos estabelecimentos hípicas, buscou-se englobar todos os segmentos do agronegócio equestre, dessa forma temos representantes do cavalo militar (Polícia Militar e Exército), do cavalo de trabalho (de lida com o gado bovino) e do cavalo de esporte/lazer em todos os seus níveis, desde o cavalo submetido à atividade física leve, até o cavalo de alta performance (Grande Prêmio).

A partir das amostras primárias (40kg), foram coletadas sub-amostras (1kg) das porções superior, intermédia e inferior das embalagens onde o alimento estava armazenado. Estas sub-amostras foram homogeneizadas e quarteadas para obter-se uma amostra representativa de 1kg (amostra de laboratório). A amostra de laboratório foi inteiramente triturada, homogeneizada e quarteada para obter-se duas sub-amostras de análise (prova e contra-prova), as quais foram armazenadas a 4°C até o seu uso.

3.2 Determinação da micoflora

A enumeração quantitativa de fungos filamentosos em unidades formadoras de colônias por grama de alimento (UFC g⁻¹) foi realizada segundo metodologia de diluição decimal seriada em placas descrita por Pitt; Hocking (1997), conforme a seguir: agitou-se em liquidificador, em copo estéril, 10 gramas da amostra em 90 mL de água destilada. Este diluente foi escolhido por ser deletério para as leveduras, já que o objetivo neste trabalho era o de recuperar a micobiota fúngica filamentosa dos substratos (ICMSF, 1986). A partir desta diluição inicial (10⁻¹) prepararam-se diluições decimais seriadas até 10⁻⁴. Inoculou-se (em triplicata) alíquotas de 0,1 ml de cada uma das diluições em três meios de cultivo: agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (PITT; HOCKING, 1997); agar dicloran glicerol a 18% (DG18) (HOCKING; PITT, 1980) e o Nash Snyder agar (NSA) (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983). As placas foram incubadas a 25° C por cinco a sete dias em estufas microbiológicas com controle eletrônico de temperatura. Todas as placas foram observadas diariamente, selecionando-se para enumeração aquelas que continham em torno de 10 a 100 UFC g⁻¹.

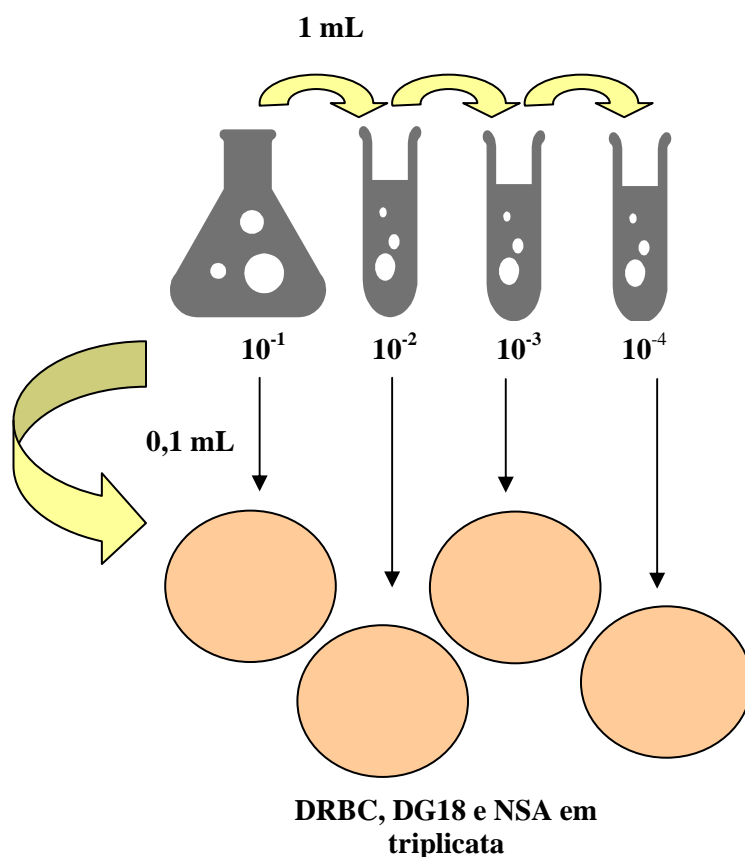


Figura 10- Esquema de diluição de amostra e contagem padrão de unidades formadoras de colônias (UFC g^{-1}).

3.3 Isolamento e identificação fúngica

A identificação, em nível de gênero, de todas as colônias consideradas como diferentes foi realizada segundo Samson et al. (2000), de acordo com suas características macro e microscópicas. As colônias fúngicas identificadas como *Aspergillus* e *Penicillium* foram subcultivadas em tubos inclinados de agar extrato de malte (MEA) e as de *Fusarium* utilizaram agar V-8 (V8) para a posterior identificação em espécies.

As cepas de fungos isoladas foram então identificadas segundo as chaves taxonômicas apropriadas de cada grupo particular: Klich (2002) para o gênero *Aspergillus*, Pitt (1988) para o gênero *Penicillium* e Nelson; Toussoun; Marasas (1983), com modificações, para espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*.

A classificação de *Aspergillus* spp. foi baseada na semeadura padrão em três meios básicos (Figura 11): agar Czapek extrato de levedura (CYA); agar Czapek extrato de levedura sacarose a 20% (CY20S) e agar extrato de malte (MEA). Foi preparada uma suspensão de conídios a partir de cada cepa, em 0,5 mL de meio agar semi-sólido (0,2% de agar-agar e 0,05% de Tween 80TM, distribuído em tubos microtubos, esterilizados por autoclavagem a 120°C por 15 minutos). A seguir, introduziu-se uma alça de platina em forma de agulha na suspensão de conídios inoculando-a nos meios de cultivo.

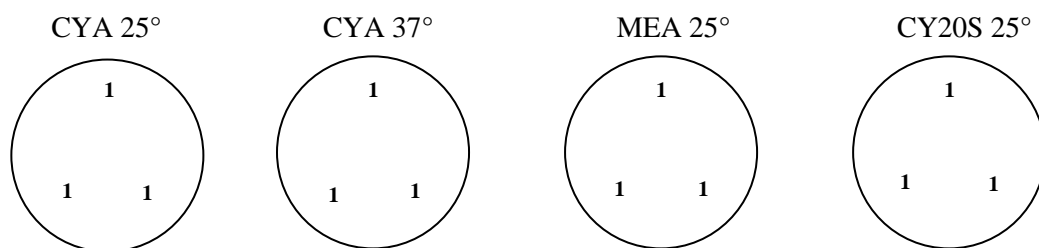


Figura 11- Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero *Aspergillus* nos meios CYA, MEA e CY20S em duas condições de temperaturas.

A chave proposta para *Penicillium* spp. foi baseada na sementeira em três meios básicos como: CYA; MEA e G25N (Figura 12); para maior eficiência e aproveitamento do sistema, certas placas de Petri foram inoculadas com duas cepas diferentes a serem testadas (PITT, 1988); a preparação do inóculo e inoculação nos meios de cultivo foi igual à utilizada para *Aspergillus* spp.

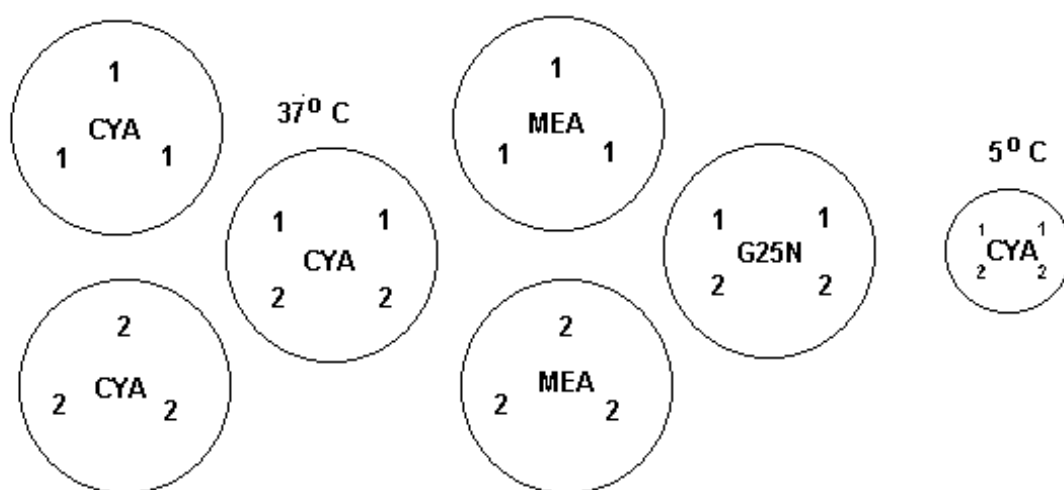


Figura 12- Esquema de inoculação e incubação das duas cepas do gênero *Penicillium* a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperatura (5, 25 e 37° C).

Fonte: PITT (1988).

As colônias de *Fusarium* spp. foram semeadas para cultivo monospórico nos meios agar folhas de bananeira (BLA), modificando a metodologia original que utiliza o meio agar folhas de cravo (CLA) e no meio agar batata dextrose (PDA), em tubo inclinado. As colônias foram incubadas por 7 dias a 24°C obedecendo fotoperíodo de 12 horas de luz branca e 12 horas de luz negra (Figura 13). O cultivo monospórico consiste em recolher pequena

quantidade de micélio da colônia subcultivada e agitá-lo em tubo com cerca de 10 mL de água destilada estéril. O conteúdo é então vertido sobre placa contendo agar água a 2% e homogeneizado em movimentos em forma de “8” sobre a bancada. O sobrenadante é descartado e a placa é incubada a temperatura ambiente inclinada em ângulo aproximado de 45°. Após período aproximado de 12 horas, as placas são examinadas através de lupa em busca de conídios germinados isolados. Um único conídio por vez é então recortado e transferido para os meios indicados.

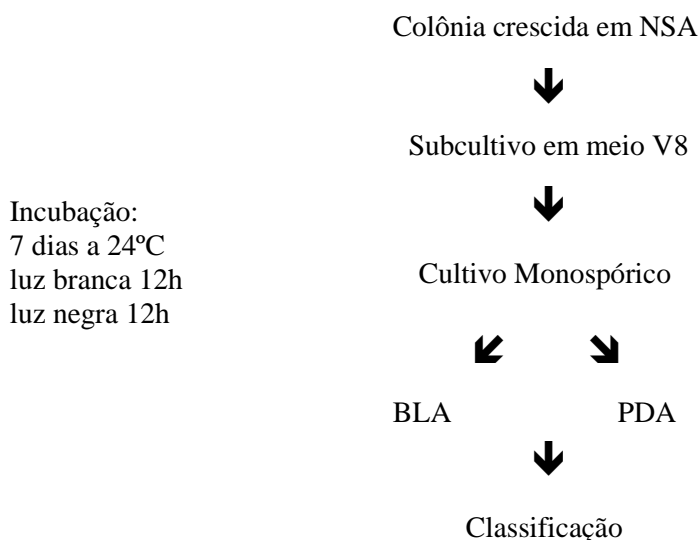


Figura 13- Esquema de incubação das cepas do gênero *Fusarium* nos diferentes meios de cultivo até sua identificação final.

3.4 Caracterização do perfil toxígeno das espécies isoladas

As espécies pertencentes às seções Flavi e Nigri do gênero *Aspergillus* e cepas de *P. citrinum* isoladas foram analisadas quanto a capacidade toxígena por cultivo em agar leite de coco (CAM), em placas de Petri de 90mm (LIN; DIANESE, 1976). Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura de 25°C por sete dias. As placas foram examinadas no sexto e sétimo dias em Cromatovisor Prodicil^{MR} equipado com lâmpada de radiação ultravioleta de 30 watts com comprimento de onda de 365 nm, onde verificou-se a presença ou não de halo de fluorescência no meio.

Após a verificação de fluorescência, todas as placas, tanto as de colônias positivas como as negativas, tiveram seu conteúdo completamente raspado e triturado em gral e pistilo juntamente com 30 mL de clorofórmio para a extração da toxina. O macerado foi filtrado obtendo-se o extrato clorofórmico que a seguir foi concentrado, a um volume final de aproximadamente 2 mL, em rotavapor acoplado com banho maria a 40°C. Os extratos foram testados qualitativamente através de TLC para confirmação dos resultados obtidos por CAM.

Foram empregadas placas de 20x20 cm de sílica gel 60 com 0,2 mm de espessura. Estas placas foram previamente ativadas por 60 minutos em temperatura de 130°C. Foram aplicados 5 µL de cada extrato e dos padrões em pontos equidistantes. Após o desenvolvimento por 50 minutos em cromatotânque saturado, a cromatoplaça foi observada em cromatovisor sob radiação UV de $\lambda=365\text{nm}$, para evidenciação das manchas fluorescentes características.

3.5 Detecção e quantificação de AFB₁ e FB₁ por ELISA

Foram utilizados *kits* comerciais desenvolvidos e produzidos pela *Beacon Analytical Systems Inc.* (Portland, Maine – EUA). O *kit* Beacon em placa utiliza o método de ELISA competitivo indireto para análise quantitativa das micotoxinas.

A toxina foi extraída da amostra agitando-a com metanol e água, conforme as instruções do fabricante para cada tipo de micotoxina (BEACON, 2008a,b). O extrato obtido foi filtrado e depois testado através do imunoensaio. O conjugado micotoxina-HRP-enzima foi pipetado nos poços, seguido dos calibradores ou extratos de amostras. Em seguida, pipetou-se a solução de anticorpo anti-micotoxina para iniciar a reação. Durante um período de incubação de 10 minutos a toxina na amostra compete com o conjugado micotoxina-HRP-enzima por um número limitado de anticorpos anti-toxina que por sua vez se ligarão aos anticorpos secundários que estão imobilizados no interior dos poços. Passado o período de incubação, o conteúdo dos poços foi descartado e os mesmos foram lavados para remoção de qualquer conjugado ou toxina que não tenha se ligado ao anticorpo. Um substrato foi adicionado nos poços e qualquer conjugado micotoxina-HRP-enzima ligado aos anticorpos converteu a solução à cor azul. Seguindo uma incubação de 10 minutos, a reação foi interrompida e a intensidade da cor de cada poço foi lida. As amostras de cores desconhecidas foram comparadas com as cores dos calibradores e a concentração de toxina das amostras foi obtida.

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

Os calibradores (padrões) de AFB₁ utilizados no *kit* corresponderam a 0, 2, 8, 20 e 80 µg/L (ppb), e para FB₁ foram 0, 0,3, 1, 3 e 6 µg/mL (ppm).

3.6 Detecção e quantificação de AFB₁ por HPLC

Utilizou-se a metodologia de extração de micotoxinas proposta por Soares; Rodriguez-Amaya (1989). O extrato clorofórmico obtido foi evaporado até *secura*, sendo acondicionado em frasco âmbar, e armazenado em freezer até a etapa de purificação.

Para purificação dos extratos foram utilizadas colunas de imunoafinidade (Figura 14) desenvolvidas e produzidas pela *Beacon Analytical Systems Inc.* (Portland, Maine – EUA) (BEACON, 2008c). O extratos secos foram ressuspensos em 1 mL de clorofórmio e seu volume foi totalmente passado pelas colunas em uma taxa de 1 gota por segundo. A seguir, as colunas foram lavadas com 2 mL de água e eluídas com 1 mL de metanol. O extrato eluído foi recolhido e acondicionado em novo frasco para imediatamente ser submetido à HPLC.

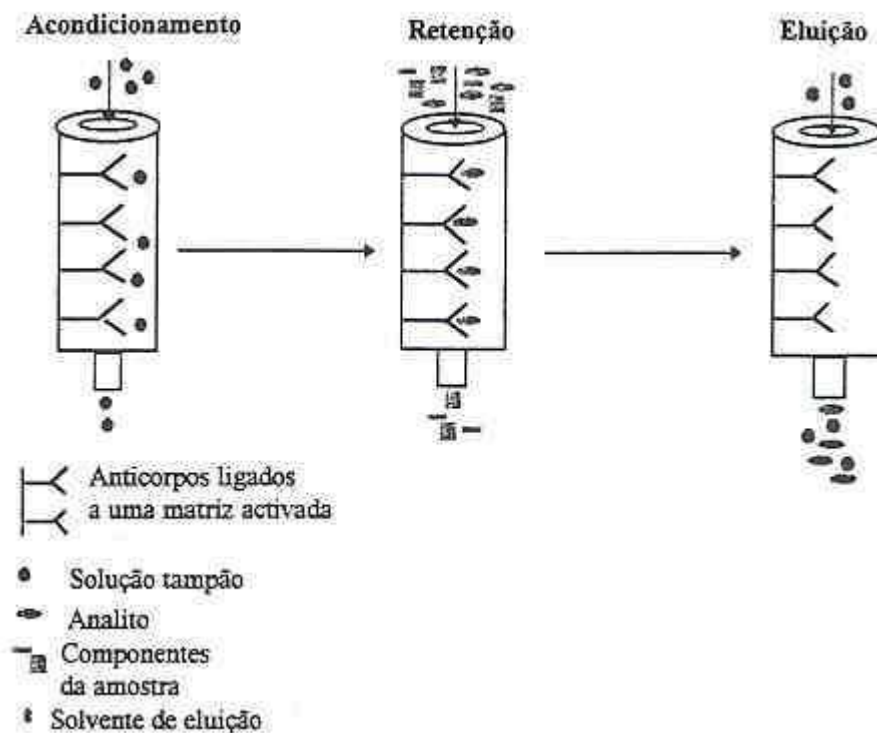


Figura 14 – Princípio de purificação das colunas de imunoafinidade.

Fonte: AMADO (2008).

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters Associates®, Inc., Miliford, M.A. - EUA) equipado com uma bomba Waters (modelo 510) de sistema isocrático, injetor Rheodyne (Rheodyne®, Cotati, California – EUA) com *loop* de 20 μL , detector Merck-Hitachi UV-VIS L-4250 ajustado para comprimento de onda de 350 nm e integrador Merck Hitachi D-2500. As separações foram desenvolvidas em coluna de sílica (VARIAM™, Walnut Creek, CA – EUA) de 150 x 4,6 mm i.d., de partícula com 5 μ de diâmetro. O padrão de AFB₁ (Sigma Co, St. Louis - EUA), foi calibrado segundo a metodologia descrita no manual de métodos oficiais de análises da AOAC (1990). Depois de diluído e quantificado (10,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por espectrofotômetro Shimadzu mod. 2001 (Shimadzu Co.®, Kyoto, Japão), o padrão foi armazenado em frasco âmbar e mantido em freezer a -18°C . A fase móvel para HPLC em fase normal foi acetato de etila: n-hexano (3: 2,5 - v/v), com fluxo de 1,5 mL/min. Foram feitas diluições seriadas do padrão e análise no cromatógrafo líquido de alta eficiência para se obter a curva de calibração, de onde foram extraídos os limites de detecção e de quantificação da técnica.

3.7 Análises estatísticas

As análises dos dados foram realizadas por análise de variância (ANOVA). Todos os dados foram transformados usando a função logarítmica $\log_{10}(x + 1)$ antes da ANOVA. O teste de Duncan foi utilizado na comparação dos dados de enumeração fúngica nos diferentes meios de cultivo, e o teste LSD de Fisher foi o escolhido para a comparação dos dados de quantificação das micotoxinas. As análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS (SAS Institute, Cary, NC).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Contaminação fúngica

A carga fúngica contaminante feita através da enumeração dos propágulos fúngicos e expressa por unidades formadoras de colônia por grama de amostra analisada (UFC g⁻¹) está apresentada na tabela 4.

Tabela 4- Contagem total dos fungos filamentosos isolados de alimentos fornecidos à equinos.

Alimentos	Contagem de propágulos fúngicos (UFC g ⁻¹) ^{AB}		
	Meios de Cultivo		
	DRBC	DG18	NSA
Aveia achatada	1,3 x 10 ⁵ ± 1,3 x 10 ⁵ ^a (1,0 x 10 ⁴ a 4,8 x 10 ⁵)	1,5 x 10 ⁵ ± 1,5 x 10 ⁵ ^a (4,0 x 10 ⁴ a 3,8 x 10 ⁵)	7,8 x 10 ⁴ ± 7,8 x 10 ⁴ ^a (1,0 x 10 ⁴ a 2,0 x 10 ⁵)
Ração batida	6,7 x 10 ⁵ ± 1,1 x 10 ⁶ ^a (4,0 x 10 ⁴ a 3,0 x 10 ⁶)	7,4 x 10 ⁴ ± 3,2 x 10 ⁴ ^{ab} (3,0 x 10 ⁴ a 1,0 x 10 ⁵)	3,6 x 10 ⁵ ± 3,6 x 10 ⁵ ^a (ND a 8,0 x 10 ⁵)
Rações esforços Leves	9,3 x 10 ⁴ ± 3,2 x 10 ⁵ ^b (ND a 1,7 x 10 ⁶)	1,7 x 10 ⁵ ± 7,1 x 10 ⁵ ^{bc} (ND a 3,8 x 10 ⁶)	8,6 x 10 ³ ± 2,5 x 10 ⁴ ^b (ND a 1,0 x 10 ⁵)
Rações esforços moderados	1,1 x 10 ³ ± 1,9 x 10 ³ ^b (ND a 6,0 x 10 ³)	3,8 x 10 ³ ± 6,0 x 10 ³ ^c (ND a 2,2 x 10 ⁴)	4,8 x 10 ² ± 8,2 x 10 ² ^b (ND a 3,0 x 10 ³)
Rações esforços intensos	1,3 x 10 ³ ± 2,9 x 10 ³ ^b (ND a 1,0 x 10 ⁴)	2,3 x 10 ³ ± 5,8 x 10 ³ ^c (ND a 2,0 x 10 ⁴)	3,0 x 10 ³ ± 8,9 x 10 ³ ^b (ND a 3,0 x 10 ⁴)

^A valores das médias ± desvio padrão.

^B intervalo dos valores máximos e mínimos.

ND não detectado. Limite de detecção da técnica: 10² UFC g⁻¹.

^a médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de Duncan: DRBC e NSA (P = 0,0001), DG18 (P < 0,001).

O meio DRBC utilizado para contagem geral é o que melhor expressa a qualidade higiênica dos alimentos, pois permite que a microbiota presente no alimento tenha condições ideais de crescimento. Assim, os resultados mostram que as maiores contaminações foram

apresentadas por amostras de aveia laminada e ração batida, e as menores, pelas de rações comerciais. A sigla GMP refere-se a uma coletânea de recomendações de boas práticas fabricação, de modo a padronizar os produtos do setor de alimentação animal quanto aos teores máximos permitidos para diversos contaminantes. O limite máximo para assegurar a qualidade higiênica dos produtos é de $1,0 \times 10^4$ UFC g⁻¹ (GMP, 2008) e na tabela 5 estão apresentados os percentuais de amostras acima deste valor.

Tabela 5- Percentual de amostras contaminadas acima dos limites recomendados.

Alimentos	DRBC	DG18	NSA
Aveia achatada	80 %	100 %	80 %
Ração batida	100 %	100 %	80 %
Rações esforços leves	26 %	33 %	11 %
Rações esforços moderados	0	15 %	0
Rações esforços intensos	0	10 %	10 %

O meio DG18 é seletivo para fungos xerofílicos, ou seja, aqueles que suportam crescimento em baixas a_w . Percebemos que todas as amostras de aveia e de ração batida apresentaram altas contagens neste meio, o que constitui um alto potencial de risco, já que neste grupo estão incluídos dois dos principais gêneros toxígenos, como *Aspergillus* e *Penicillium*. Isso indica que, quando o fungo encontrar condições ambientais adequadas, ele poderá proliferar e produzir toxinas e isso é comum nos casos de armazenagem imprópria em lugares quentes e úmidos.

O meio NSA é seletivo para fungos do gênero *Fusarium*. Trata-se de um fungo fitopatogênico, que em geral infecta os cereais ainda no campo. Diversos tratamentos químicos e físicos (tais como extrusão e peletização) são utilizados no processamento de rações, com o objetivo de incrementar a eficiência de sua utilização, aproveitando melhor o potencial do animal. Estes processos melhoram a eficiência alimentar devido à combinação da umidade, calor e pressão, que gelatinizam ou rompem a estrutura das partículas dos alimentos, melhorando assim a utilização dos nutrientes.

A maioria dos autores concorda que a peletização diminui a carga bacteriana e microbiana das rações, evitando a deterioração dos nutrientes e transmissão de patógenos. Estudo realizado em 1995 (GIMENO, 2008), avaliando uma ração para leitões peletizada a 100°C com uma pressão de 1 a 2 kg/cm², concluíram que o processo empregado pode reduzir a carga bacteriana inicial ao redor de 6 vezes e em 20 vezes a carga máxima em relação a ração farelada. A peletização a 100°C elimina a presença de coliformes na ração e pode reduzir a carga inicial de proteolíticos em mais de sete vezes. Os fungos podem ser reduzidos em 15 vezes sua carga inicial e em sete vezes sua carga máxima na ração peletizada. Estes dados comprovam os nossos resultados onde foi observada diferença significativa entre as contagens dos alimentos comerciais para os não-comerciais em todos os meios de cultivo. Não foi observada diferença significativa entre os alimentos não-comerciais e as amostras de rações esforços leves no meio de cultivo DG18; isso pode ser em parte explicado pela qualidade das matérias-primas utilizadas neste tipo de formulação; muitas indústrias utilizam neste segmento de rações grãos de cereais que apresentam algum tipo de dano, pois estes são adquiridos por um preço mais barato; e deixam para utilizar aqueles grãos perfeitos e intactos para as formulações mais caras.

Ressalta-se ainda o fato de que as micotoxinas, geralmente apresentam grande estabilidade química, o que permite a sua persistência no alimento, mesmo após a remoção

dos fungos pelos processos de industrialização. Outro aspecto importante da ação dos fungos é o impacto sobre o valor nutricional das matérias primas utilizadas na elaboração de rações, causando empobrecimento energético dos grãos (CHELKOWSKY, 1991).

4.2- Determinação da microbiota

Foram isoladas 293 cepas fúngicas pertencentes a seis gêneros filamentosos, além da ordem Mucorales, conforme figura 15. Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e seus teleomorfos (43%), *Penicillium* e seus teleomorfos (26%) e *Fusarium* (11%) foram os mais frequentes na micoflora isolada. Estes gêneros englobam a grande maioria das espécies citadas na literatura como produtoras de micotoxinas.

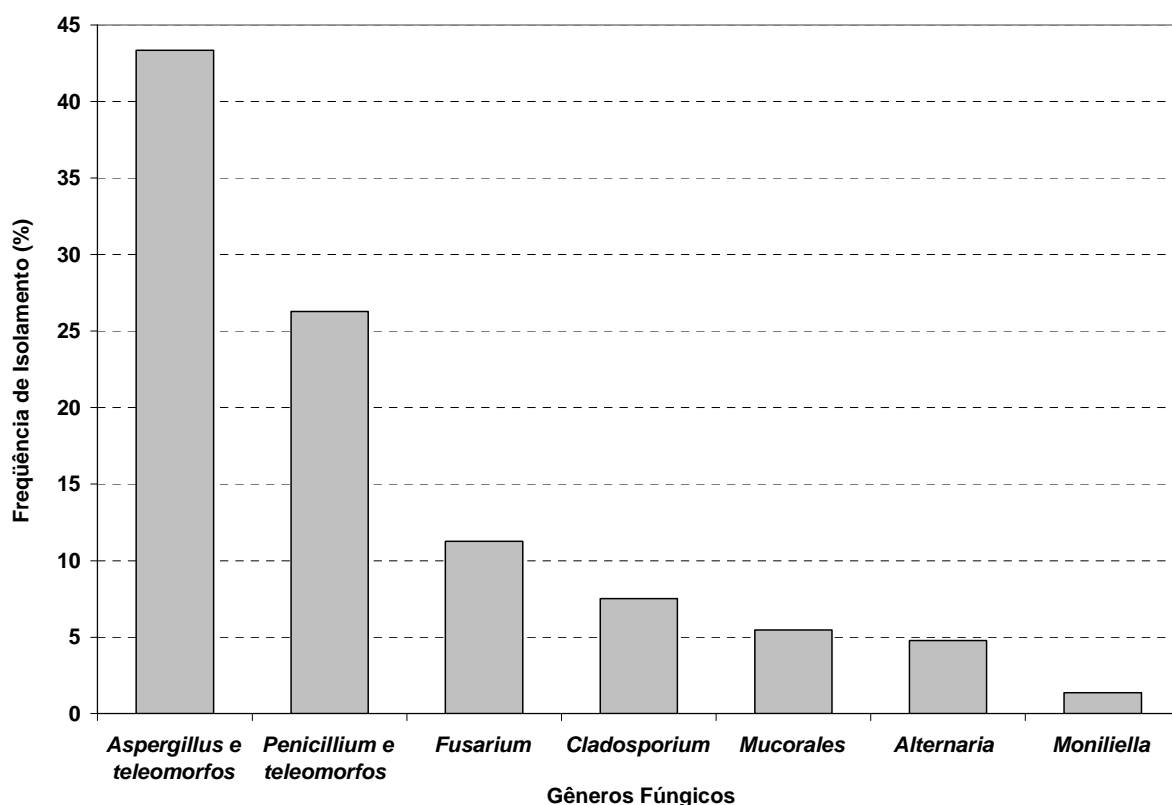


Figura 15- Frequência (%) de gêneros fúngicos isolados dos alimentos destinados à equinos.

Devido à escassez de dados na literatura sobre a avaliação micotoxicológica de rações destinadas ao consumo equino, iremos relacionar este estudo com investigações realizadas em diferentes matérias primas e com rações terminadas de outras espécies animais, onde o milho seja ingrediente básico na dieta. Assim, Rosa et al. (2006) e Oliveira et al. (2006) encontraram resultados similares aos nossos quando estudaram a microbiota tóxigena de produtos vegetais e rações destinadas à alimentação de frangos de corte em quatro fábricas de rações do Estado do Rio de Janeiro. Estes autores observaram que o gênero *Aspergillus*, foi o mais frequente (41%), seguido por *Penicillium* sp. (40%) e *Fusarium* sp. (15%), dentre outros.

Também foram similares aos nossos, os estudos de monitoramento micológico realizados na Argentina em amostras de rações para frangos de corte, as quais foram coletadas durante dois anos de diferentes fábricas. Estas também demonstraram a presença destes três

gêneros toxígenos como os mais freqüentes; além disso, foram isoladas em menor porcentagem, espécies dos gêneros *Cladosporium* (Prancha 1) e *Alternaria* (Prancha 2), entre outros (DALCERO et al. 1997, 1998; MAGNOLI et al. 2002). Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* também foram reportados como os mais ocorrentes em amostras de rações para suínos e coelhos daquele país (MAGNOLI et al. 2005, GONZÁLEZ- PEREYRA et al. 2008). Na Argentina, as rações peletizadas de frangos e suínos contém aproximadamente 60% de milho. E nas rações para coelhos, o milho é substituído por alfafa, aveia e cevada, de acordo com a disponibilidade no mercado. Estas amostras aproximam-se muito, portanto, dos ingredientes utilizados em rações para eqüinos.

Neste estudo, treze espécies de *Aspergillus* foram identificadas nas amostras analisadas, além do estado teleomórfico *Eurotium* sp., conforme figura 16 e pranchas 3 a 11. O *A. niger* foi a espécie mais freqüente (27%), seguido pelo *A. flavus* (25%), que é citado como potencial produtor de AFB₁ e AFB₂. Outro fungo de importância isolado foi o *A. ochraceus*, que juntamente com o *A. niger* são citados na literatura como potenciais produtores de OTA em países de climas tropical e subtropical (ABARCA et al., 2001; MAGNOLI et al., 2007).

O estudo anteriormente citado com rações para suínos na Argentina encontrou *A. flavus*, *A. niger* e *A. parasiticus* como os mais isolados, com freqüências de isolamento de até 14%, 8% e 6%, respectivamente. Fraga et al. (2007) analisaram amostras de milho e de rações para os diferentes estágios de criação de frangos de corte no Estado do Rio de Janeiro. *A. flavus*, *A. candidus* e espécies de *Eurotium* foram as mais observadas nas amostras de milho e ração inicial. Já nas amostras de ração de terminação, os mais freqüentes foram novamente *A. flavus*, espécies de *Eurotium* e *A. niger*, além de *A. sydowii* e *A. versicolor*. Percebemos que todos os fungos citados foram isolados em diferentes porcentagens no nosso trabalho, com exceção de *A. parasiticus*, o qual só esteve presente nos trabalhos argentinos; fato este interessante já que a ecofisiologia de *A. flavus* e *A. parasiticus* é muito similar (PITT; HOCKING, 1997).

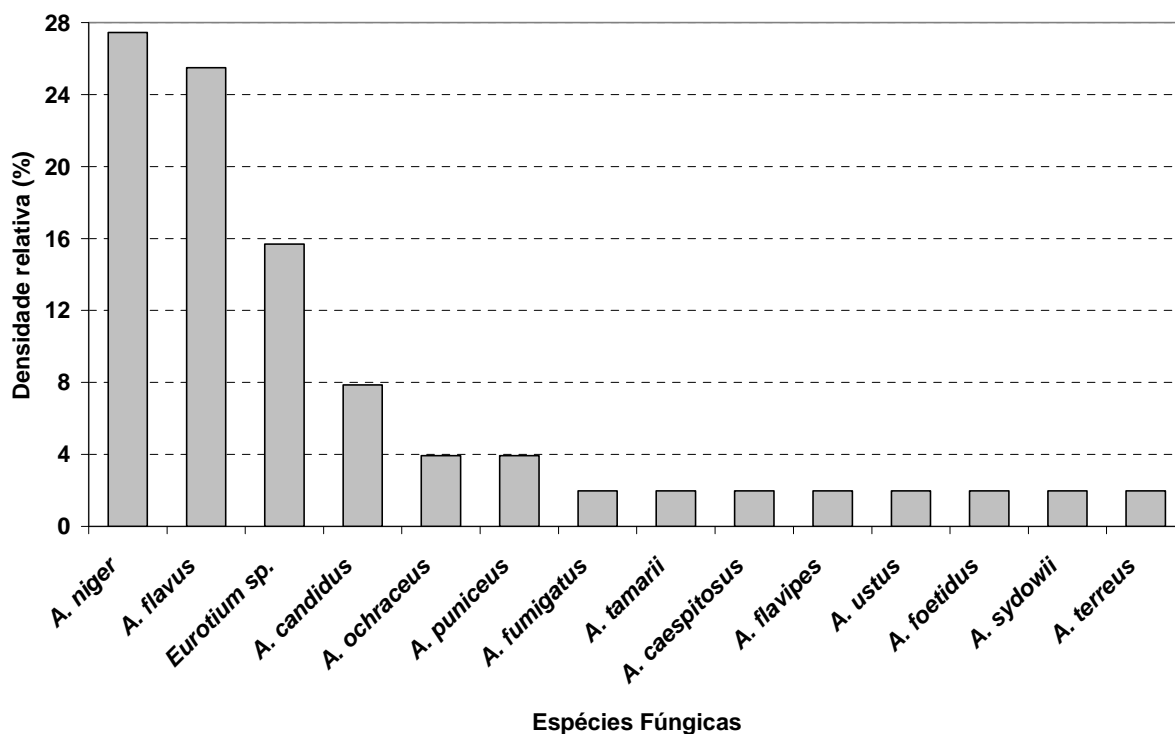


Figura 16- Densidade relativa (%) de espécies de *Aspergillus* em alimentos destinados à eqüinos.

Quanto ao gênero *Penicillium*, treze espécies foram identificadas neste estudo, além de uma cepa do gênero *Eupenicillium*, sua forma teleomórfica, conforme figura 17 e pranchas 12 a 18. *P. corylophilum* foi a espécie mais freqüente (19%), seguido por *P. fellutanum* (14%). Em geral, grande variedade de espécies deste gênero, têm sido isoladas de diferentes rações para animais (ROSA et al. 2006; MAGNOLI et al., 2005). Espécies biverticiladas e terverticiladas pertencentes aos subgêneros *Furcatum*, *Biverticillium* e *Penicillium* são as mais freqüentes. As espécies *P. funiculosum*, *P. citrinum*, *P. simplicissimum*, *P. commune*, *P. brevicompactum* e *P. raistrickii* são potenciais produtoras de metabólitos secundários tóxicos, como: patulina, citrinina, ácidos penicílico, ciclopiazônico e micofenólico, além de toxinas tremorgênicas, respectivamente (PITT; HOCKING, 1997). A presença destas cepas em rações animais implica em elevado risco, pois a maioria destes compostos já tiveram sua toxicidade demonstrada em experimentos com animais (LACEY, 1990).

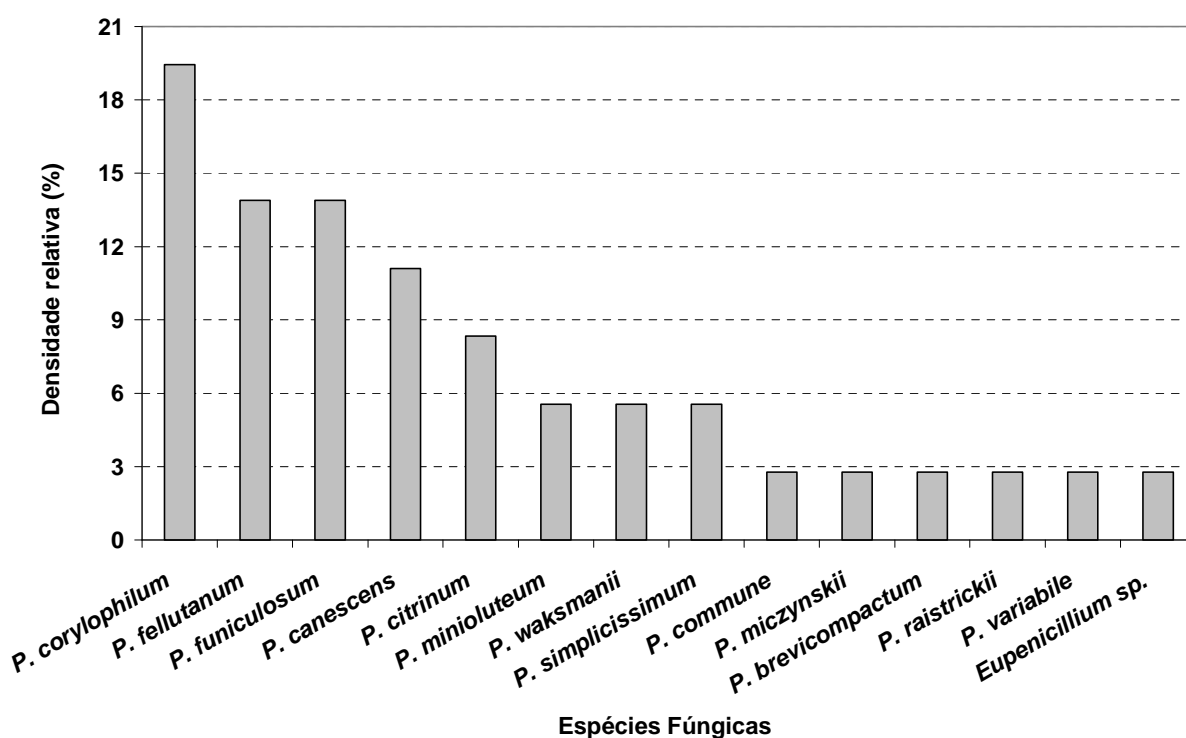


Figura 17- Densidade relativa (%) de espécies de *Penicillium* em alimentos destinados à equinos.

A única espécie de *Fusarium* isolada foi *F. verticillioides* (100%). *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* são as espécies mais comumente associadas com a contaminação do milho e seus produtos derivados. *F. verticillioides* está associado à doenças que ocorrem em todos os estágios de desenvolvimento do cultivo de milho, infectando raízes, caules e grãos. Este fungo não só é o mais comum patógeno do milho, mas está também entre os fungos mais encontrados em plantas assintomáticas. Ele é quase que um companheiro constante do cultivo de milho e suas sementes (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

4.3- Perfil toxígeno: habilidade como produtor

Dentre as cepas de *Penicillium citrinum* isoladas, todas revelaram fluorescência amarelada e foram capazes de produzir citrinina quando cultivadas em CAM e confirmadas por TLC. Quanto as cepas de *A. niger*, 30% se mostraram fluorescentes, de coloração esverdeada e foram ocratoxígenas (OTA), enquanto que 25% das cepas de *A. flavus* produziram uma fluorescência azulada (Prancha 19) e foram aflatoxígenas (AFB₁ e AFB₂).

A presença de espécies aflatoxígenas e ochratoxígenas evidencia a necessidade de serem aprofundadas as pesquisas; seria importante manter o estudo na tentativa de quantificar OTA e citrinina, já que encontram-se presentes cepas produtoras. Percebe-se que a determinação da micoflora é de grande importância porque pode prover informações sobre as micotoxinas que potencialmente estariam presentes na amostra.

4.4- Análises micotoxicológicas

4.4.1- Fumonisina B₁

A análise por ELISA indicou contaminação por FB₁ em cerca de 75% das amostras; na figura 18 podemos verificar o nível de contaminação por cada tipo de alimento e na tabela 6 observamos as médias obtidas. Vale ressaltar que 100% das amostras de ração batidas apresentaram contaminação e nos níveis mais elevados. Foi obtido um bom coeficiente de determinação para o kit, R²=0,98, conforme figura 19.

Fusarium verticillioides e *F. proliferatum*, são os dois principais produtores de FBs. Estas duas espécies são as de maior importância e reconhecidas por infectarem com frequência cultivos de milho em todo o mundo (MARASAS et al, 1984; ROSS et al, 1990; NELSON, 1992). Isso explica em parte porque as culturas de aveia não exibem níveis altos, as quais em geral, conforme citação na literatura, apresentam contaminação mais elevada de citrinina e tricotecenos.

Com respeito às rações terminadas, estudos conduzidos por Dupuy et al. (1993) demonstraram a termoestabilidade desta micotoxina diante dos diferentes tratamentos térmicos a que é submetido este cereal na fabricação de alimentos. Outros autores citam que a FB₁ tem uma meia vida aproximada de 10 min a 150°C, 38 min a 125°C, 175 min a 100°C, e 8 h a 75°C (DOKO; VISCONTI, 1994; DOMBRINK-KURTZMAN et al., 2000). Este fato pode explicar porque há uma diferença significativa nos níveis de contaminação das amostras de ração batida, que não sofrem nenhum tratamento térmico, para as amostras de rações comerciais, submetidas a peletização e/ou extrusão. Entretanto, como os próprios autores indicam, não há destruição completa da molécula de FB₁, apresentando níveis residuais que necessitariam de outros processos de detoxificação.

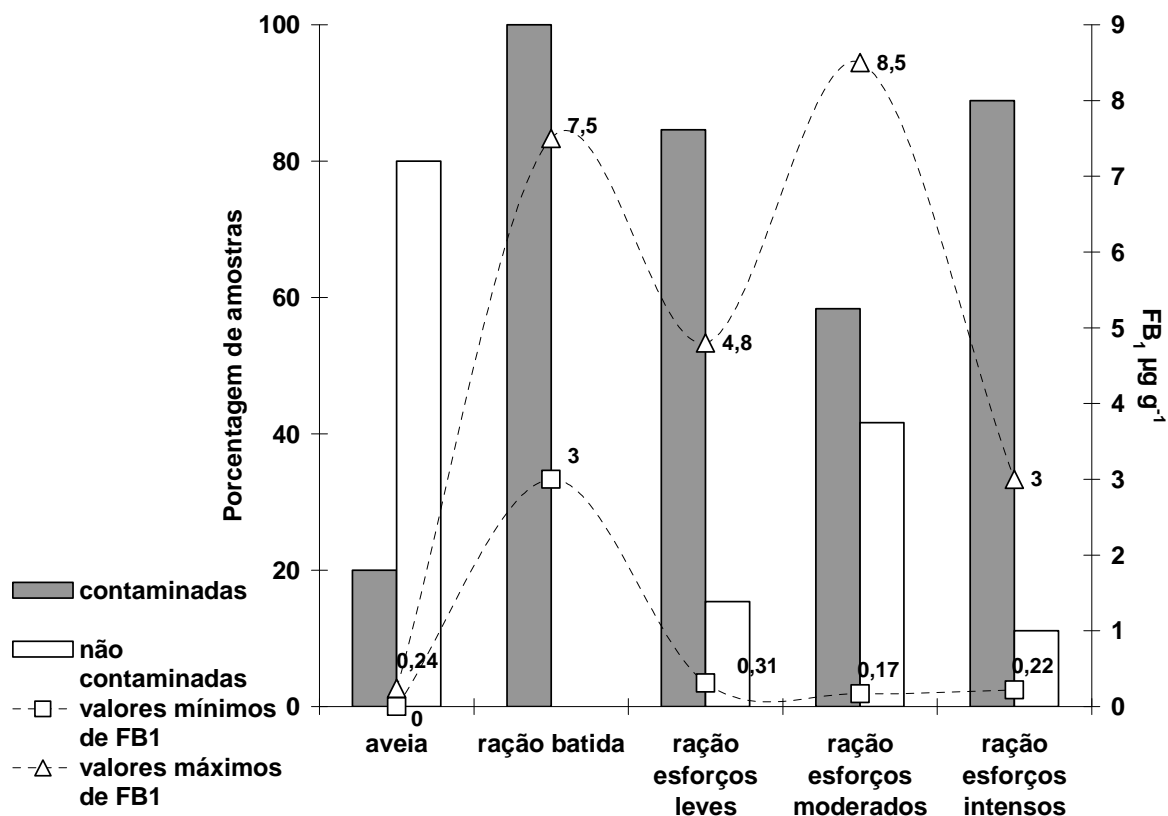


Figura 18- Níveis de contaminação de FB₁ quantificados através de ELISA, nas diferentes categorias de alimentos fornecidos à equinos.

Tabela 6- Média e desvio padrão dos níveis de FB₁ quantificados através de ELISA, nas diferentes categorias de alimentos fornecidos à equinos.

Alimentos	FB ₁ ($\mu\text{g g}^{-1}$ ou ppm)
	média \pm desvio padrão
Aveia achatada	0,05 \pm 0,11 ^a
Ração batida	5,05 \pm 1,80 ^b
Rações esforços leves	0,75 \pm 0,96 ^a
Rações esforços moderados	1,24 \pm 2,53 ^a
Rações esforços intensos	1,40 \pm 1,11 ^a

^a médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

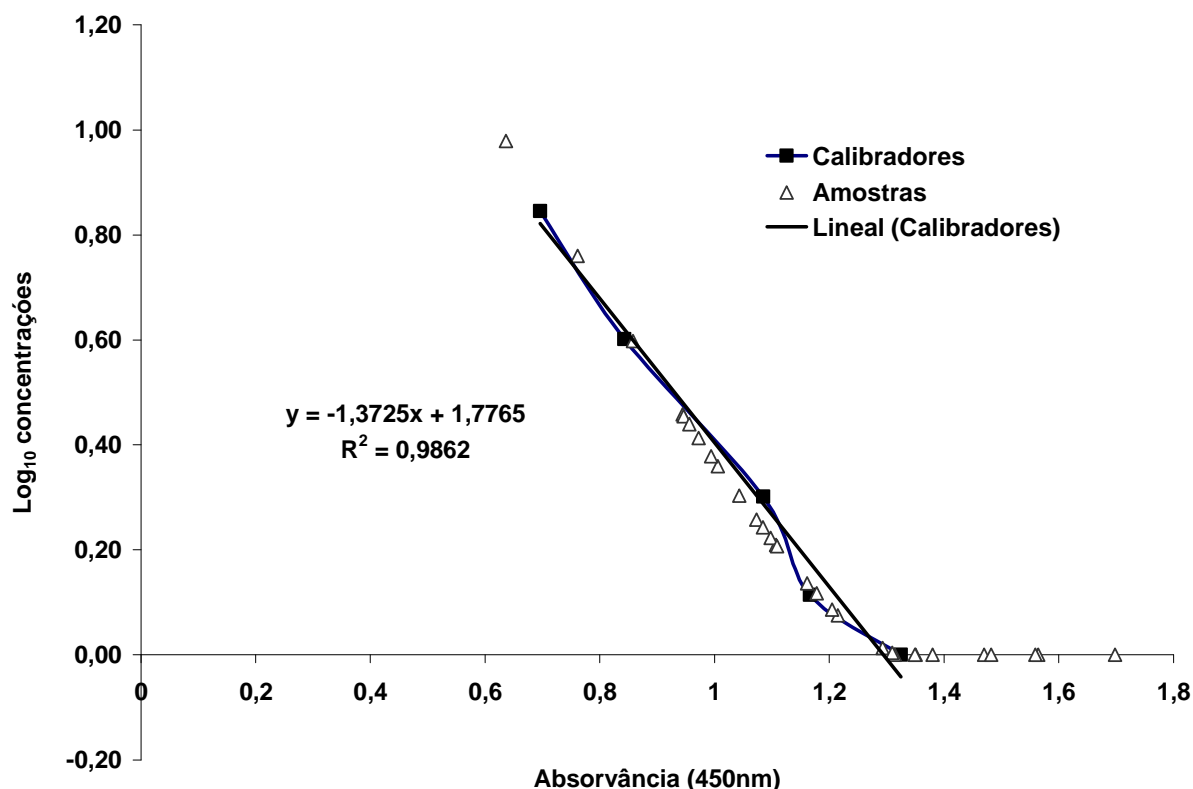


Figura 19- Regressão linear do *kit* ELISA para quantificação de FB₁.

4.4.2- Aflatoxina B₁

Somente duas amostras foram negativas para aflatoxinas; as amostras de aveia apresentaram a menor média, enquanto que as de ração esforços leves a maior, conforme figura 20. O valor da média e desvio padrão dos demais substratos estão representados na tabela 7 e nos mostram que não houve diferença significativa entre os alimentos analisados. Também foi obtido um bom coeficiente de determinação neste *kit*, R²=0,98 (Figura 21).

Tabela 7- Média e desvio padrão dos níveis de AFB₁ quantificados através de ELISA, nas diferentes categorias de alimentos fornecidos à equinos.

Alimentos	AFB ₁ (µg Kg ⁻¹ ou ppb)
	média ± desvio padrão
Aveia achatada	1,99 ± 2,71 ^a
Ração batida	4,92 ± 5,74 ^a
Rações esforços leves	10,17 ± 20,06 ^a
Rações esforços moderados	7,19 ± 9,96 ^a
Rações esforços intensos	8,27 ± 4,20 ^a

^a médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher (P ≤ 0,05).

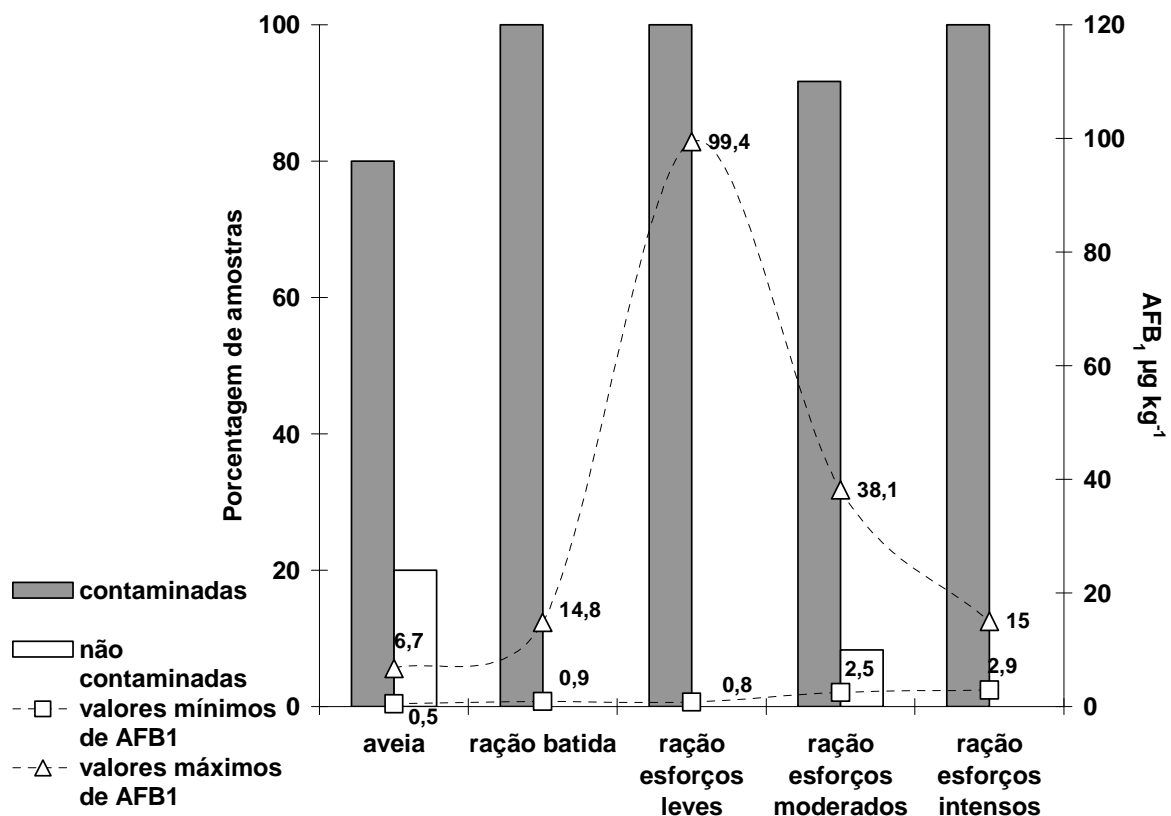


Figura 20- Níveis de contaminação por AFB₁ quantificados através de ELISA, nas diferentes categorias de alimentos fornecidos à equinos.

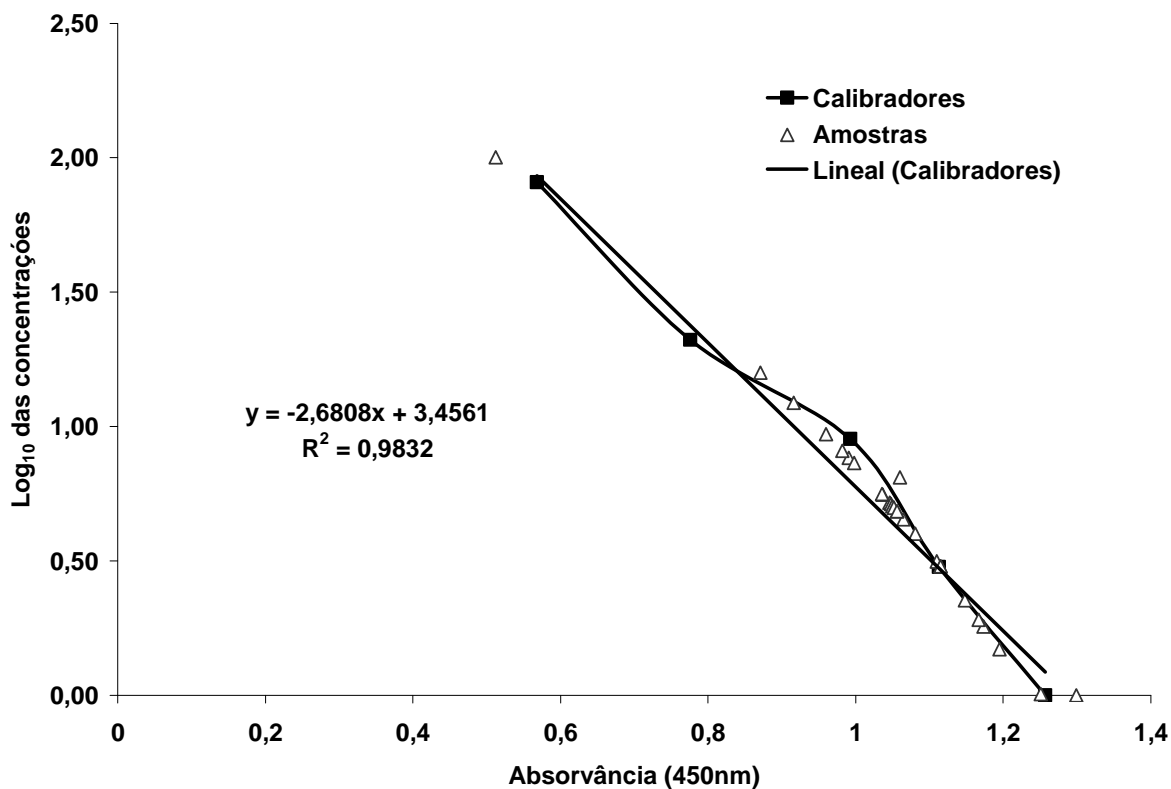


Figura 21- Regressão linear do kit ELISA para quantificação de AFB₁.

Estudos mostram que temperaturas acima de 150°C são necessárias para se conseguir destruição parcial da molécula; os resultados dependerão ainda da interação de diversos outros fatores como: tipo de alimento, carga inicial contaminante, tempo/temperatura de exposição, entre outros. As aflatoxinas apresentam altas temperaturas de decomposição, variando entre 237°C a 306°C (HAMEED, 1993; RUSTOM, 1997). Percebemos com isso que as aflatoxinas são e continuarão sendo um grande problema enquanto não forem atingidas medidas de controle antes da colheita e pós-colheita. Antes da colheita devem-se utilizar variedades de cereais mais resistentes e boas práticas agrícolas; e a contaminação pós-colheita pode ser minimizada com boas práticas na secagem, separação dos grãos, transporte e armazenamento.

Nossos resultados indicam que 93% das amostras analisadas estiveram abaixo dos limites máximos permitidos pela legislação atual (Figura 22). As leis brasileiras permitem níveis de até 50 ppb de aflatoxinas totais nas matérias primas utilizadas para alimentação animal (MAPA, 1988), porém a implicação na saúde humana, os efeitos na saúde dos eqüinos, assim como os prejuízos econômicos da contaminação dos alimentos por micotoxinas, geram necessidades urgentes de que esta legislação, que já é muito antiga, seja revista e de que se estabeleçam mecanismos de controle capazes de serem atingidos níveis muito mais baixos. Os atuais limites máximos regulamentados na União Européia (EU, 2001) são mais restritivos: 20ppb de aflatoxinas totais, trazendo fortes implicações econômicas para os países exportadores, como o Brasil, que vêm enfrentando sérias dificuldades para manter e alcançar novos mercados.

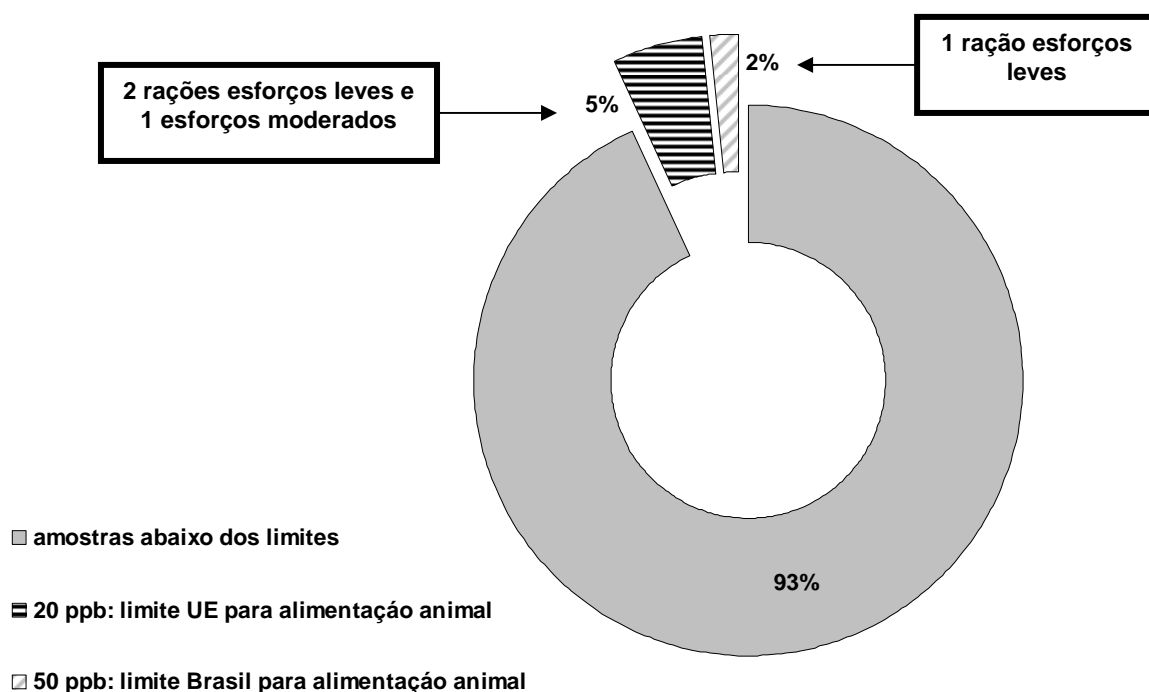


Figura 22- Percentual de amostras dos alimentos destinados à eqüinos, contaminadas segundo cada legislação.

Após curva de calibração da técnica de HPLC utilizada em nossas amostras, foram obtidas as seguintes referências: Limite de detecção = 1 ppb; Limite de quantificação = 3 ppb; Recuperação média para AFB₁ = 88%; e Tempo de retenção médio = 3,2 min.

Para comparação entre os resultados de AFB₁ quantificados através de ELISA e de HPLC utilizamos a correlação de Pearson, obtendo cerca de 70% de similaridade. Percebe-se com isso que, a metodologia de ELISA é muito rápida e prática, permitindo a avaliação de grande número de amostras em curto período de tempo e sem requerimento de técnicos especialistas no manuseio do equipamento; sendo, portanto de fundamental serventia aos profissionais/proprietários a campo que necessitam de um diagnóstico rápido, para que se estabeleçam medidas de proteção ao plantel. Entretanto, quando se busca uma avaliação precisa, com grande confiança dos níveis de contaminação, deve-se utilizar o método de HPLC.

Existiu uma co-ocorrência de FB₁ e AFB₁ em 72% das nossas amostras analisadas, fato este agravante já que a FB₁ interage com a AFB₁ acelerando o processo de formação do câncer hepático em animais de experimentação (GELDERBLOM et al., 2002). Estudos desenvolvidos em frangos, indicam efeitos aditivos destas duas micotoxinas (KUBENA et al., 1995), enquanto em outro estudo os autores concluíram que somente a AFB₁ manifestava seus efeitos (WEIBKING et al., 1994). Em suínos, as pesquisas indicam efeitos sinérgicos (HARVEY et al., 1995).

5- CONCLUSÕES

- ✓ Os alimentos fornecidos aos eqüinos encontram-se contaminados por diversas espécies potencialmente toxígenas, elevando o risco da ocorrência de micotoxicoses de evolução crônica.
- ✓ Os tratamentos térmicos a que são submetidos os alimentos durante seu beneficiamento e industrialização reduzem consideravelmente a carga microbiana total quando comparados com amostras “naturais”.
- ✓ AFB₁ e FB₁ foram co-ocorrentes nas amostras, todavia este tema é bastante controverso e não há descrição dos efeitos desta interação na espécie eqüina. Bem como a interação com outras micotoxinas, já que também se encontravam presentes espécies produtoras de citrinina e o OTA.
- ✓ A metodologia mais adequada na detecção e determinação de micotoxinas nos alimentos será a combinação do ELISA com o HPLC, destinando-se as colunas de IAC à purificação das amostras.
- ✓ O ELISA poderá ser utilizado para uma detecção rápida e quantificação de várias amostras ao mesmo tempo; e a IAC/HPLC poderá ser utilizada para a análise quantitativa das amostras positivas nas quais deseje-se obter maior especificidade e um limite de detecção mais baixo. O TLC servirá perfeitamente para os casos onde apenas a análise qualitativa/semiquantitativa, seja suficiente.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R.; CABAÑES, F.J. Current importance of ochratoxin A producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 6, p. 903-906, 2001.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023 - Informação e documentação - Referências - Elaboração**. Rio de Janeiro: ABNT. 2002. 24 p.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10522 - Informação e documentação - Citações em documentos - Apresentação**. Rio de Janeiro: ABNT. 2002. 7 p.
- ALLER, W.W.; EDDS, G.T.; ASQUITH, R.L. Effects of aflatoxins in young ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 12, p. 2162-2164, 1981.
- AMADO, M.A. **Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos: vantagens e inconvenientes**. Disponível em: <http://www.ipv.pt/millennium/Millennium26/26_21.htm>. Acesso em: 20 mai 2007.
- ANGSUBHAKORN, S.; POOMVISES, P.; ROMRUEN, K.; NEWBERNE, P.M. Aflatoxicosis in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 178, n. 3, p. 274-278, 1981.
- ASQUITH, R.L.; EDDS, G.T. Investigations in equine aflatoxicosis. **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, v. 26, p. 193-200, 1980.
- BARROS, G. **Ecofisiología y diversidad genética de *Aspergillus* sección Flavi aislados de suelo de la zona manisera de la Provincia de Córdoba**. Río Cuarto, Córdoba: Universidad Nacional de Río Cuarto. 2006. Tesis doctoral.
- BEACON ANALYTICAL SYSTEMS, INC. **Aflatoxin Plate Kit**. USA, 2008a. Disponível em: <http://www.beaconkits.com/product_detail.cfm?ID=57>. Acesso em: 19 abr 2003.
- BEACON ANALYTICAL SYSTEMS, INC. **Fumonisin Plate Kit**. USA, 2008b. Disponível em: <http://www.beaconkits.com/product_detail.cfm?ID=58>. Acesso em: 19 abr 2003.

- BEACON ANALYTICAL SYSTEMS, INC. **Aflatoxin ImmunoAffinity Column**. USA, 2008c. Disponível em: < http://www.beaconkits.com/product_detail.cfm?ID=69>. Acesso em: 19 abr 2003.
- BUCKLEY, S.S.; MACCALLUM, W.G. Acute hemorrhagii encephalitis prevalent among horses in Maryland. **American Veterinary Review**, v.25, p. 99-101, 1901.
- BUTLER, T. Notes on a feeding experiment to produce leucoencephalitis in a horse with positive results. **American Veterinary Review**, v. 26, p. 748-751, 1902.
- CAST - COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Micotoxins: risks in plant, animal and humans systems**. USA, Iowa: Task Force Report nº 139, 2003. 199 p.
- CHELKOWSKI, J. Mycological quality of mixed feeds and ingredients. In: CHELKOWSKI, J. (Ed.). **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. Amsterdam: Elsevier. 1991. p. 217-227.
- CNA - CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Estudo do Complexo do Agronegócio Caval**. Brasília: CNA, 2004. 68 p. (Coletânea Estudos Gleba nº 39).
- DALCERO, A.M.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 179-184, 1997.
- DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M.M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 37-43, 1998.
- DILKIN, P.; MALLMANN, C.A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In: XI ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 2004, Piracicaba - SP. **Anais do XI Encontro Nacional de Micotoxinas**, SP: Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004. p. 32-35.
- D'MELLO, J.P.F.; PLACINTA, C.M.; MACDONALD, A.M.C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3, p. 183-205, 1999.

- DOKO, M.B.; VISCONTI, A. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, v. 11, n. 4, p. 433-439, 1994.
- DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; DVORAK, T.J.; BARRON, M.E.; ROONEY, L.W. Effect of nixtamalization (alkaline cooking) on fumonisin contaminated corn for production of masa and tortillas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5781-5786, 2000.
- DOWD, P.F. Insect interactions with mycotoxin-producing fungi and their hosts. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.; ARORA, D.K. (Eds.). **Handbook of Applied Mycology**, v. 5, **Mycotoxins in Ecological Systems**. USA: Marcel Dekker Basel. 1992. p. 137-155.
- DRAF - DIRECTION RÉGIONALE DE L'AGRICULTURE ET DE LA FORÊT DE LORRAINE. **Chainettes de microconidies sur monophialides de *Fusarium verticillioides***. Francia, 2008. Disponível em: <http://draf.lorraine.agriculture.gouv.fr/phpwebgallery/picture.php?cat=16&image_id=107>. Acesso em: 19 abr 2008.
- GIMENO, A. Los Hongos y las Micotoxinas en la Alimentación Animal; Conceptos, Problemas, Control y Recomendaciones. **Engormix.com espanhol**. 2008. Disponível em: <http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=362&AREA=BAL>. Acesso em: 19 abr 2008.
- EUROPEAN UNION (EU). Commission Regulation (EC) n° 466 of 8 March 2001. **Official Journal of the European Union**. l. 77, p. 1-13, 16 March 2001.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. **FAO Food and Nutrition Paper**, v. 64, p. 1-43, 1997.
- FRAGA, M.E.; CURVELLO, F.A.; GATTI, M.J.; CAVAGLIERI, L.R.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 343-353, 2007.
- FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. CHELKOWSKI, J. (Ed.). Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 441-476.

- FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-174, 2004.
- GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAR, R.; KRIEK, N.P. Fumonisin: novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, 1988.
- GELDERBLOM, W.C.A.; MARASAS, W.F.O.; LEBEPE-MAZUR, S.; SWANEVELDER, S.; VESSEY, C.J.; HALL, P. de la M. Interaction of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in a short-term carcinogenesis model in rat liver. **Toxicology**, v. 171, n. 2-3, p. 161-173, 2002.
- GMP⁺ Certification Scheme Animal Feed Sector. 2006. **Appendix 1: Product standards (including residue standards)**. The Hague, the Netherlands: Productschap Diervoeder. p. 1 – 39. 2008.
- GONZÁLEZ PEREYRA, M.L.; PEREYRA, C.M.; RAMIREZ, M.L.; ROSA, C.A.R.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. Determination of mycobiota and mycotoxins in pig feed in central Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 555-561, 2008.
- GREENE, H.J.; OEHME, F.W. A possible case of equine aflatoxicosis. **Clinical Toxicology**, v. 9, n. 2, p. 251-254, 1976.
- HAMEED, H.G. **Extrusion and chemical treatments for destruction of aflatoxin in naturally-contaminated corn**. Arizona, USA: University of Arizona. Available from: University Microfilms, Ann Arbor, MI: 48106–1346. 1993. Ph.D. dissertation, 101 p.
- HARVEY, R.B.; EDRINGTON, T.S.; KUBENA, L.F.; ELISSALDE, M.H.; ROTTINGHAUS, G.E. Influence of aflatoxin and fumonisin B₁-containing culture material on growing barrows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 12, p. 1668–1672, 1995.
- HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.
- IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances; food items and**

constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC, 1993. p. 489-521. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 56).

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal.** Rio de Janeiro: IBGE. 31p. (volume 31). 2003.

ICMSF – INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications.** 2nd ed. Toronto, Ontário: University of Toronto Press, 1986.

KELLER, K.M.; QUEIROZ, B.D.; KELLER, L.A.M.; RIBEIRO, J.M.M.; ROSA, C.A.R. Isolamento e identificação de fungos toxígenos isolados de amostras de rações destinadas à alimentação de eqüinos no Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v. 25, n. 1, p. 92-96, 2004.

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

KELLERMAN, T.S., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.; CAWOOD, M.; COETZER, J.A. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 4, p. 269-275, 1990.

KLICH, M.A.; PITT, J.I., **Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs.** Sydney – Austrália: Academic Press, 1988. 116p.

KLICH, M.A. **Identification of Common *Aspergillus* Species.** Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2002. 122 p.

KUBENA, L.F.; EDRINGTON, T.S.; KAMPS-HOLTZAPPLE, C.; HARVEY, R.B.; ELISSALDE, M.H.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of feeding fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and aflatoxin singly and in combination to turkey poult. **Poultry Science**, v. 74, n. 8, p. 1295–1303, 1995.

LACEY, J. Mycotoxins in UK cereals and their control. **Aspects of Applied Biology**, v. 25, p. 395-405, 1990.

- LILLEHOJ, E.B. Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. (Eds.). **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Ratón: CRC Press, 1991. p. 1-35.
- LOGRIECO, A.; MULÈ, G.; MORETTI, A.; BOTTALICO, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 7, p. 597–609, 2002.
- MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; SAENZ, M.A. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathologia**, v. 142, n. 1, p. 27-32, 1998.
- MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G.; ANGELETTI, A.; HALLAK, C.; DALCERO, A. The mycobiota and toxicity of feedstuffs from a production plant in Cordoba, Argentina. **Mycotoxin Research**, v. 18, p. 7-22, 2002.
- MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; CHIACCHIERA, S.M.; PALACIOS, G.; DALCERO, A. Surveillance of toxigenic fungi and ochratoxin A in feedstuffs from Córdoba province, Argentina. **Veterinary Research Communications**. v. 29, n. 5, p. 431-445. 2005.
- MAGNOLI, C.E.; ASTORECA, A.L.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, v. 163, n. 5, p. 249-260, 2007.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Portaria nº 07 de 09 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 de novembro de 1988, Seção 1, p. 21968.
- MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLUM, W.C.A.; COETZER, J.A.W.; THIEL, P.G.; VAN DER LUGT, J.J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 4, p. 197-203, 1988.
- MARASAS, W.F.O.; NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A. **Toxigenic *Fusarium* species, identify and mycotoxicology**. USA: Pennsylvania State University Press, University Park. 1984. 328p.
- MILLER, J.D. Review: Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.

- MORGAVI, D.P; RILEY, R.T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 201–212, 2007.
- MOSS, M.O. Mycology of cereal grain and cereal products. In: CHELKOWSKI, J. (Ed.). **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 23-51.
- MORTIMER, D.N.; GILBERT, J., SHEPHERD, M.J. Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxins M₁, in liquid and powdered milk using affinity column cleanup. **Journal of Chromatography**, v. 407, p. 393-398, 1987.
- MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in Maize: Can We Reduce Their Occurrence? **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.
- NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. (Eds.). **Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification**. USA: The Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.
- NELSON, P.E. Taxonomy and biology of *F. moniliforme*. **Mycopathologia**, v. 117, n.1-2, p. 29-36, 1992.
- OLIVEIRA, G.R.; RIBEIRO, J.M.; FRAGA, M.E.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; KELLER, K.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 162, n. 5, p. 355-362, 2006.
- PIMENTEL, D. World resources and food losses to pests. In: GORHAM, J.R. (Ed.). **Ecology and Management of Food Industry Pests**. Arlinton, Virginia: FDA Technical Bulletin n. 4, Association of Official Analytical Chemists. 1991. p. 5-11.
- PITT, J.I., Food spoilage and biodeterioration. In: COLE, G.T.; KENDRICK, B. (Eds.). **Biology of Conidial Fungal**. New York: Academic Press, v. 2, 1981. p. 111-142.
- PITT, J.I. **A Laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2nd ed. Sydney, Australia: CSIRO, Division of Food Processing. 1988. 186p.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2nd ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

- REGO, C.L. Doença de sintomatologia nervosa causada por intoxicação pelo milho. **Revista Militar de Remonta e Veterinária**, v. 10, p. 199-215, 1950.
- RIET-CORREA, F.; MEIRELES, M.C.A.; SOARES, J.M.; MACHADO, J.J.; ZAMBRANO, A.F. Leucoencefalomalácia em eqüinos associada à ingestão de milho mofado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, p. 27-30, 1982.
- RINALDI, M.G. Invasive aspergillosis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 1061-1077, 1983.
- ROSA, C.A.R. **Micobiota toxígena e ochratoxinas em rações destinadas à alimentação de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal**. Seropédica, Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2002. Tese de Doutorado (Ciências Veterinárias). 147p.
- ROSA, C.A.R.; RIBEIRO, J.M.M.; FRAGA, M.E.; GATTI, M.; CAVAGLIERI, L.R.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M.; LOPES, C.W.G. Mycobiota of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 89-96, 2006.
- ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; OSWEILER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisins by *F. moniliforme* and *F. proliferatum* isolated associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 3225-3226, 1990.
- ROSS, P.F.; RICE, L.G.; REAGOR, J.C.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M., NELSON, H.A.; OWENS, D.L.; PLATTNER, R.D.; HARLIN, K.A.; RICHARD, J.L. Fumonisin B₁ concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, n. 3, p. 238-241, 1991.
- RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.
- SAMSON, R.A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6 ed., Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. 2000. 388 p.
- SCOTT, P.M. (Associate chapter editor). Natural Poisons (section 49). In: AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the**

Association of Official Analytical Chemists, 15th edition. Washington, DC, EUA: Association of Official Analytical Chemists, 1990. p. 1184-1213.

SIDHU, G.S. Mycotoxin genetics and genes clusters. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 7, p. 705-711, 2002.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUES-AMAYA, D. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

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

TRUCKSESS, M.W. Mycotoxins. **Journal of AOAC Internacional**, v. 89, n. 1, p. 270-284, 2006.

VESONDER, R.; HALIBURTON, J.; GOLINSKY, P. Toxicity of field samples and *Fusarium moniliforme* from feed associated with equine-leukoencephalomalacia. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 18, n. 3, p. 439-442, 1989.

WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; RILEY, R.T.; MERRILL JR, A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 22, p. 1486-1490, 1991.

WANG, E., ROSS, F.P., WILSON, T.M., RILEY, R.T.; MERRILL JR, A.H. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies, given, feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **The Journal of Nutrition**, v. 122, n. 8, p. 1706-1716, 1992.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; ROTTINGHAUS, G.E. Individual and combined effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in the young turkey poult. **Poultry Science**, v. 73, n. 10, p. 1517-1525, 1994.

WICKLOW, D.T. Adaptation in *Aspergillus flavus*. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v. 31, p. 511-523, 1990.

WILLETTS, H.J.; BULLOCK, S. Developmental biology of sclerotia. **Mycological Research.**, v. 96, p. 801-816, 1992.

WILSON, B.J.; MARONPOT, R.R. Causative fungus agent of leukoencephalomalacia in equine animals. **Veterinary Record**, v. 88, p. 484-486, 1971.

WILSON, T.M.; NELSON, P.E.; MARASAS, W.F.; THIEL, P.G.; SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; NELSON, H.A.; ROSS, P.F. A mycological evaluation and *in vivo* toxicity evaluation of feed from 41 farms with equine leukoencephalomalacia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, n. 4, p. 352-354, 1990.

ANEXO

A - PRANCHAS FOTOGRÁFICAS

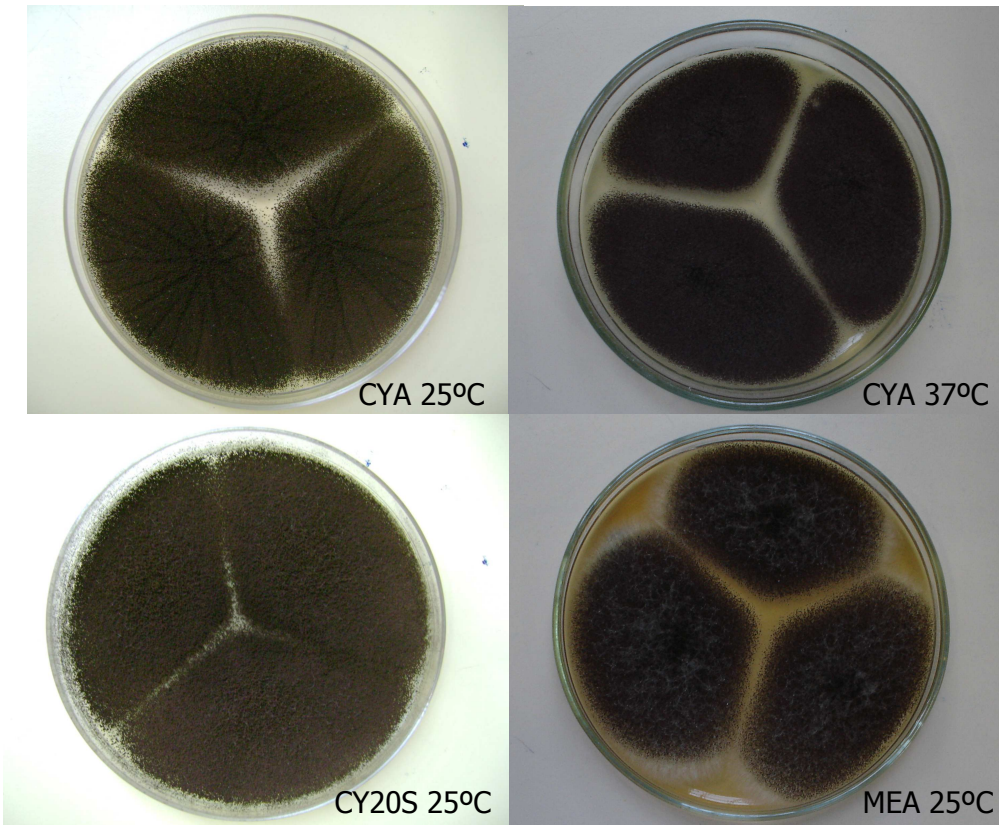
	Página
Prancha 1: Características microscópicas de <i>Cladosporium</i> sp.	56
Prancha 2: Características microscópicas de <i>Alternaria</i> sp.	56
Prancha 3: Características macroscópicas de <i>Aspergillus niger</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	57
Prancha 4: Características macroscópicas de <i>Aspergillus flavus</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	57
Prancha 5: Características macro e microscópicas de <i>Aspergillus ochraceus</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	58
Prancha 6: Características macroscópicas de <i>Aspergillus fumigatus</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	58
Prancha 7: Características macroscópicas de <i>Aspergillus caespitosus</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	59
Prancha 8: Características macroscópicas de <i>Aspergillus ustus</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	59
Prancha 9: Características macroscópicas de <i>Aspergillus sydowii</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	60
Prancha 10: Características macroscópicas de <i>Aspergillus terreus</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	60
Prancha 11: Cleistotécio: estrutura característica de <i>Eurotium</i> sp. Estado teleomórfico do gênero <i>Aspergillus</i> .	60
Prancha 12: Características macroscópicas de <i>Penicillium corylophilum</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	61
Prancha 13: Características macroscópicas de <i>Penicillium felutanum</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	61
Prancha 14: Características macroscópicas de <i>Penicillium funiculosum</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	62
Prancha 15: Características macroscópicas de <i>Penicillium canescens</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	62
Prancha 16: Características macro e microscópicas de <i>Penicillium citrinum</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	63
Prancha 17: Características macroscópicas de <i>Penicillium simplicissimum</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	63
Prancha 18: Características macroscópicas de <i>Penicillium commune</i> isolado de alimentos destinados à equinos.	64
Prancha 19: Fluorescência azulada obtida a partir de uma cepa de <i>Aspergillus flavus</i> .	64



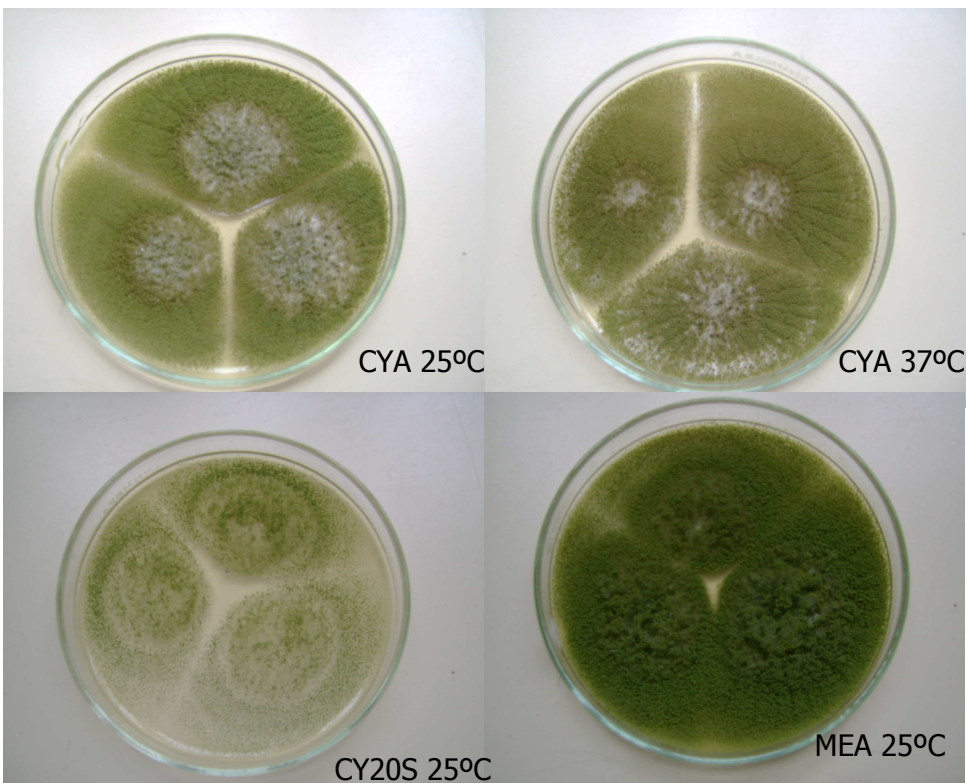
Prancha 1- Características microscópicas de *Cladosporium* sp.



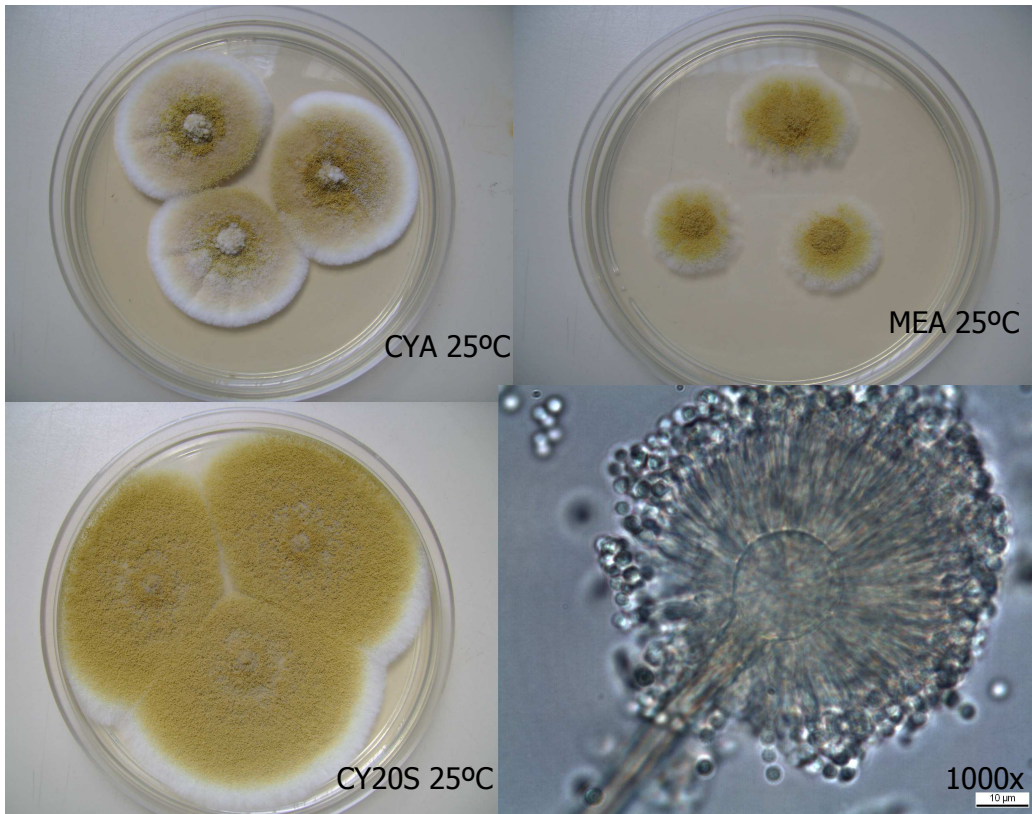
Prancha 2- Características microscópicas de *Alternaria* sp.



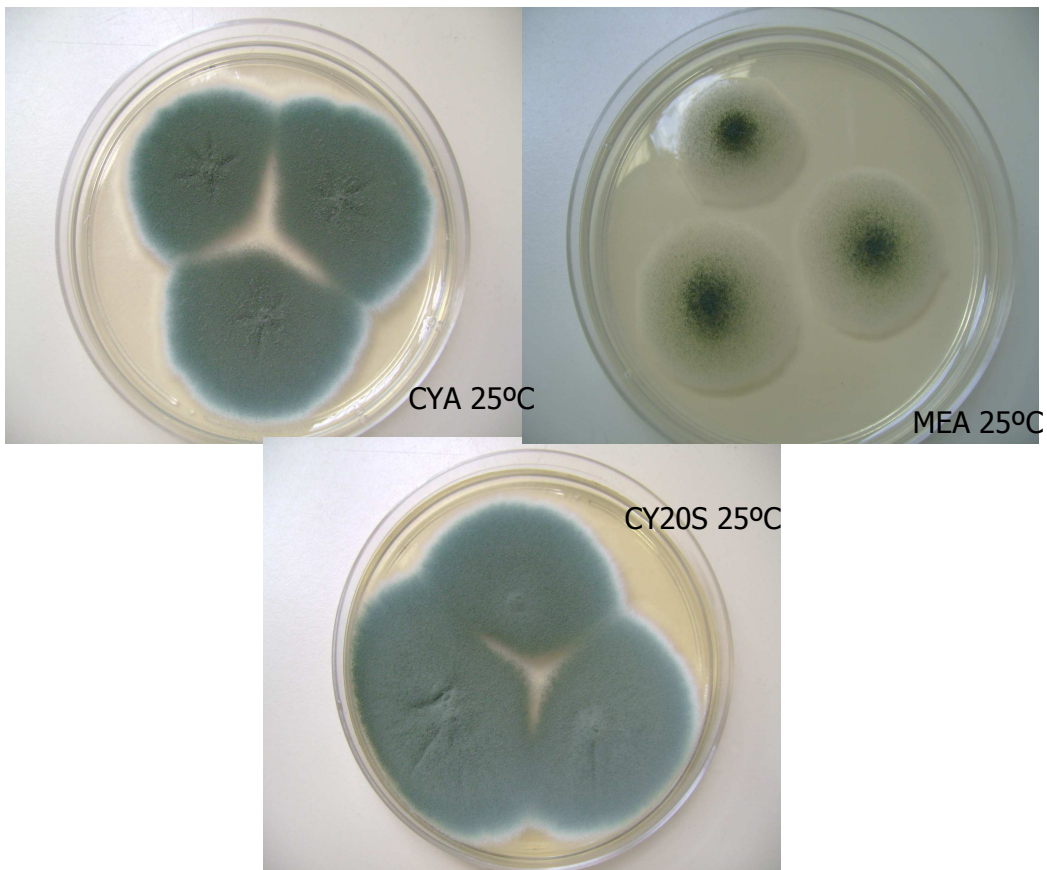
Prancha 3- Características macroscópicas de *Aspergillus niger* isolado de alimentos destinados à equínos.



Prancha 4- Características macroscópicas de *Aspergillus flavus* isolado de alimentos destinados à equínos.



Prancha 5- Características macro e microscópicas de *Aspergillus ochraceus* isolado de alimentos destinados à equinos.



Prancha 6- Características macroscópicas de *Aspergillus fumigatus* isolado de alimentos destinados à equinos.

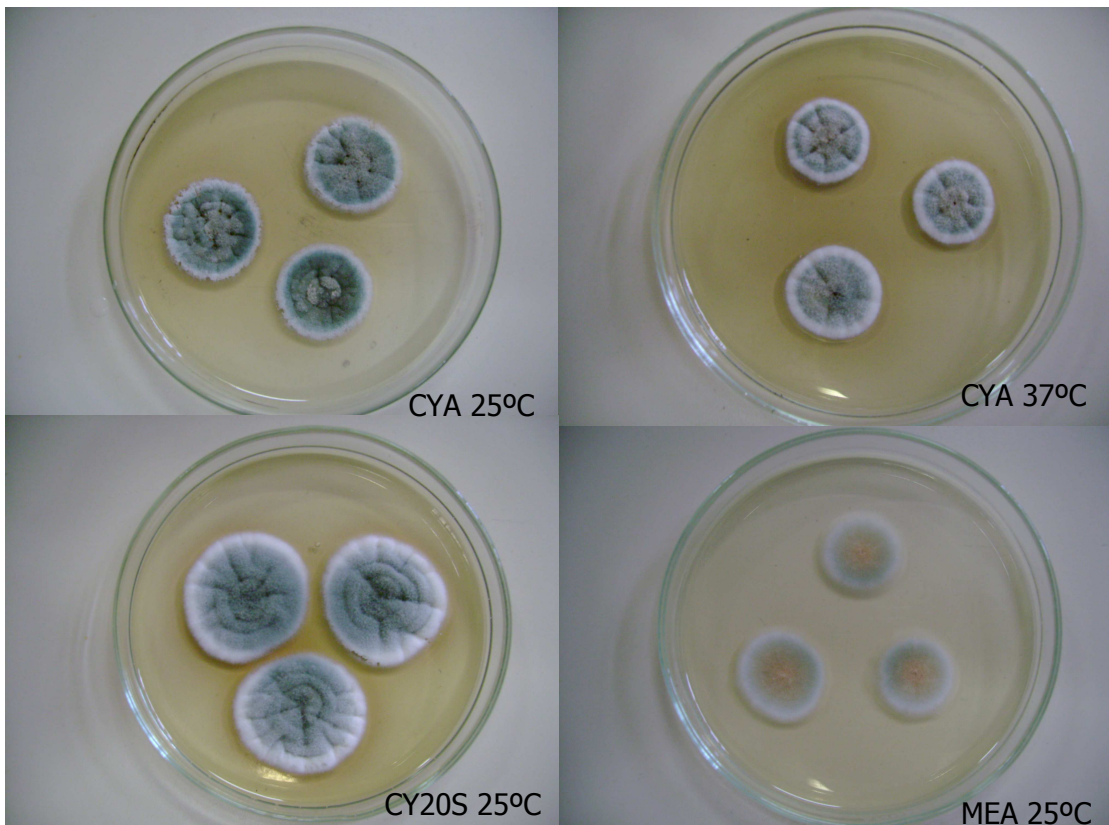


MEA 25°C

CYA 25°C

CY20S 25°C

Prancha 7- Características macroscópicas de *Aspergillus caespitosus* isolado de alimentos destinados à equinos.



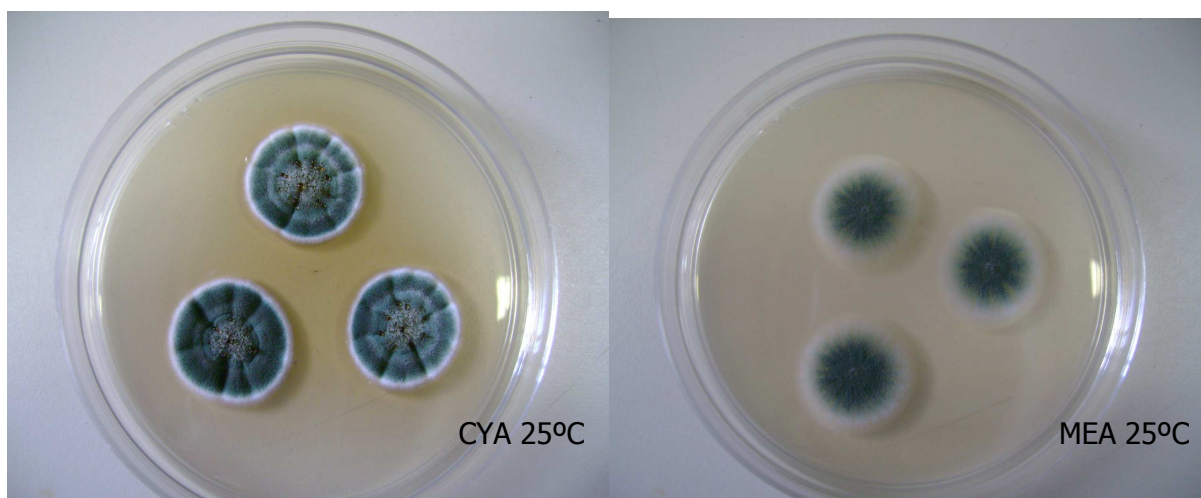
CYA 25°C

CYA 37°C

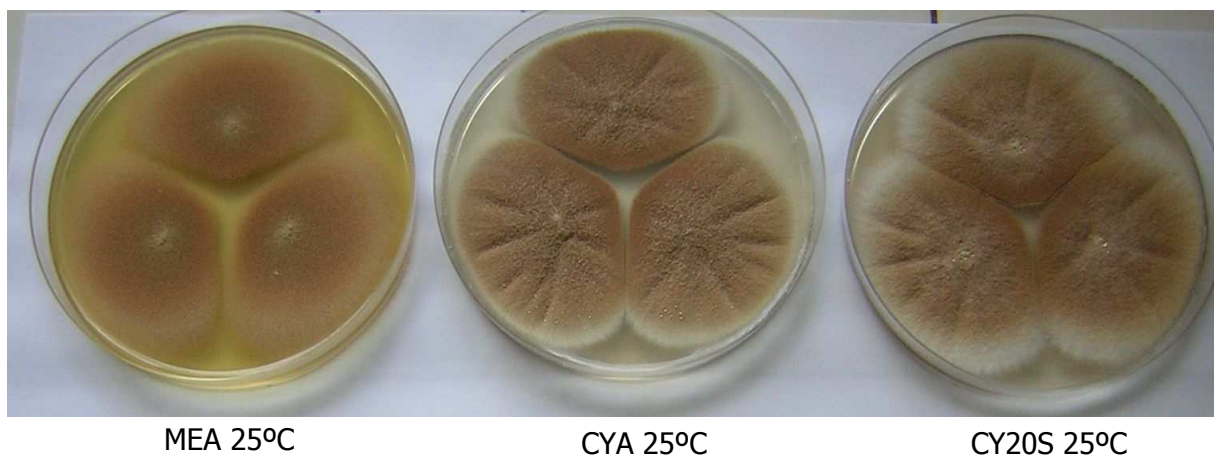
CY20S 25°C

MEA 25°C

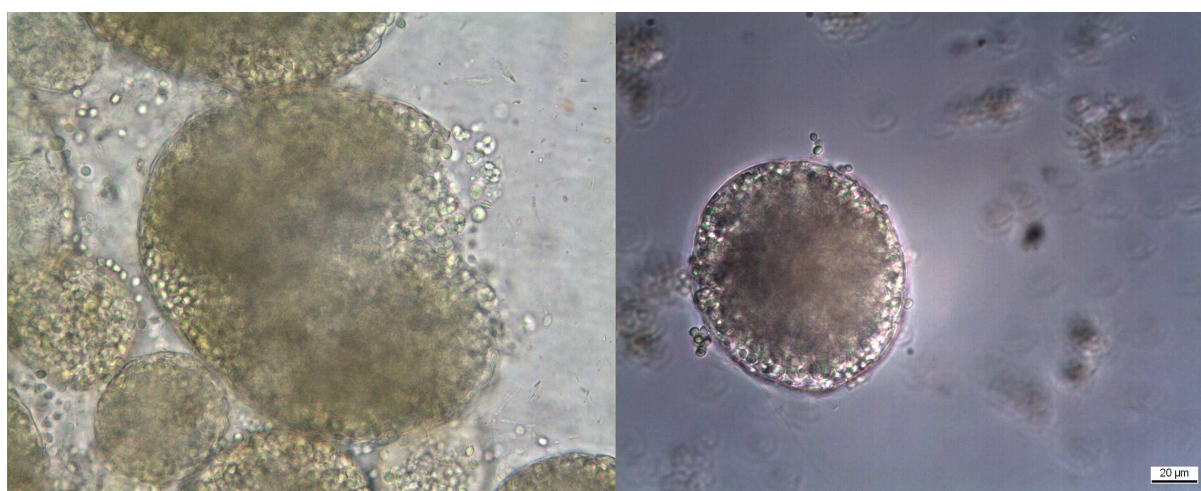
Prancha 8- Características macroscópicas de *Aspergillus ustus* isolado de alimentos destinados à equinos.



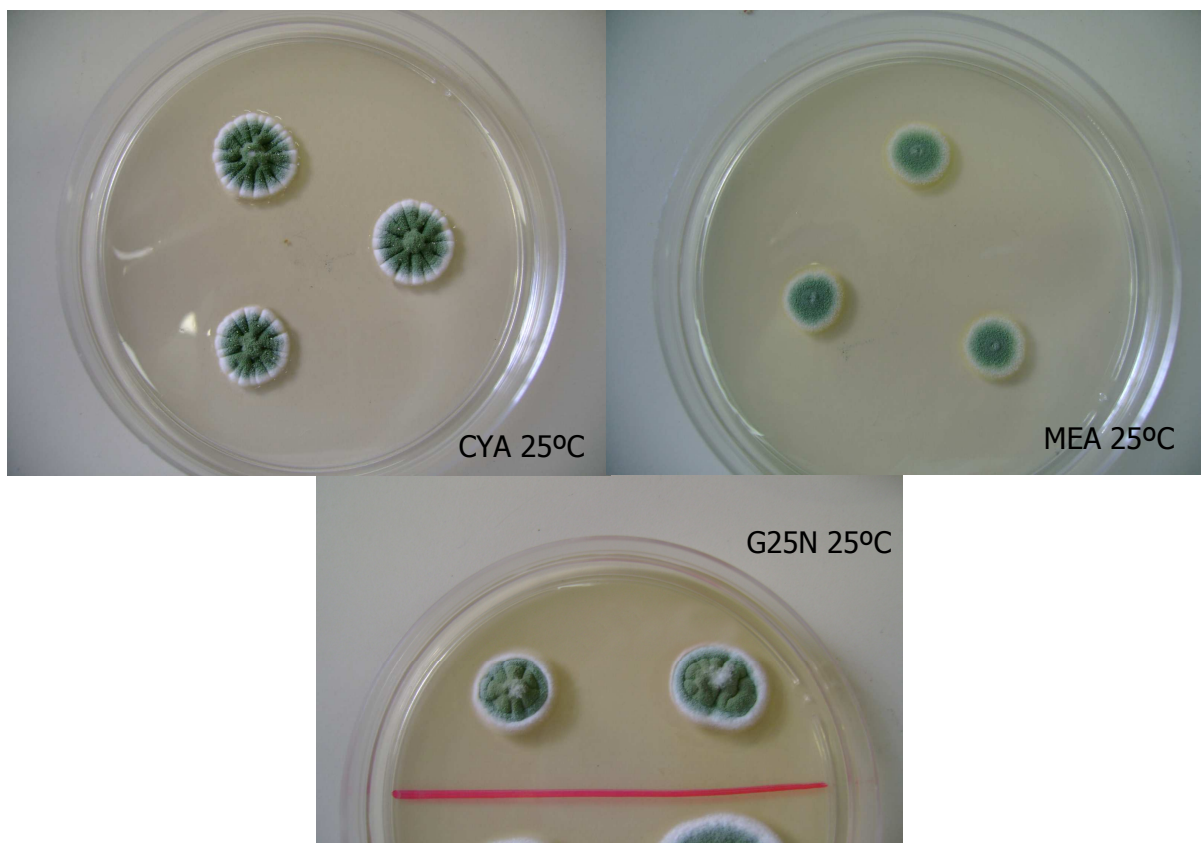
Prancha 9- Características macroscópicas de *Aspergillus sydowii* isolado de alimentos destinados à equinos.



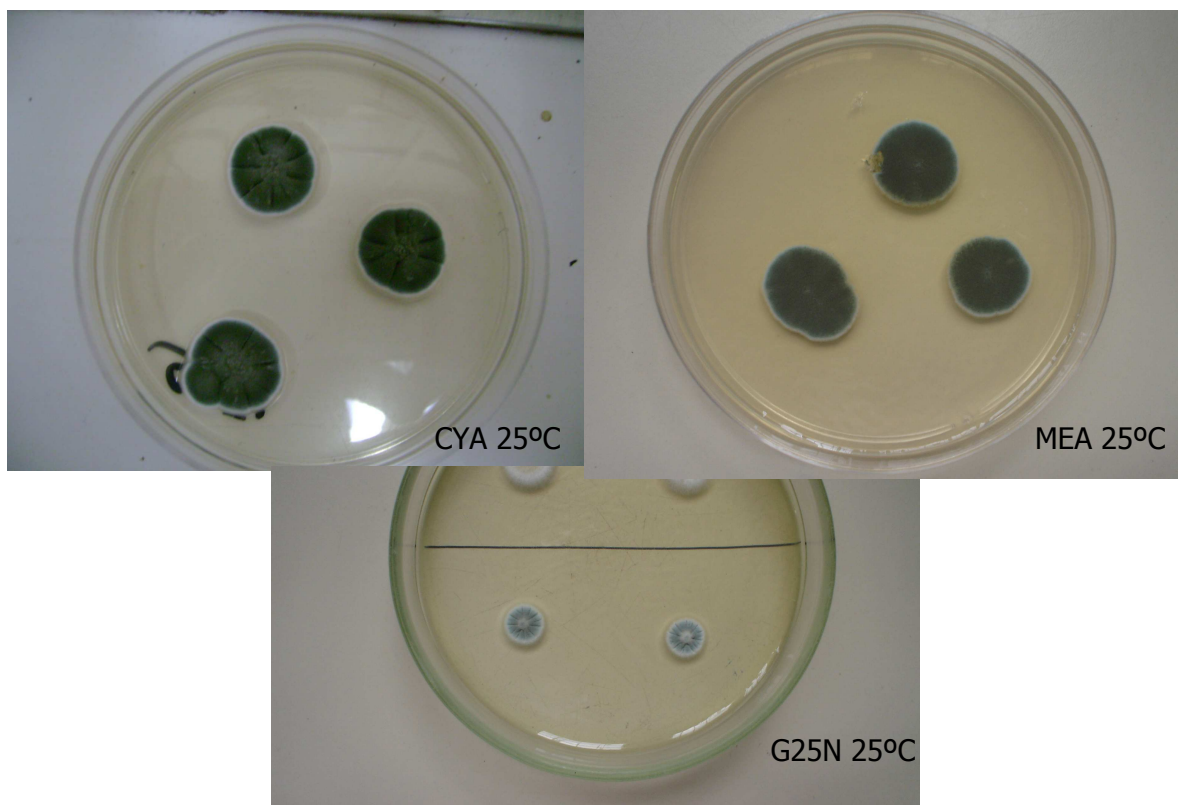
Prancha 10- Características macroscópicas de *Aspergillus terreus* isolado de alimentos destinados à equinos.



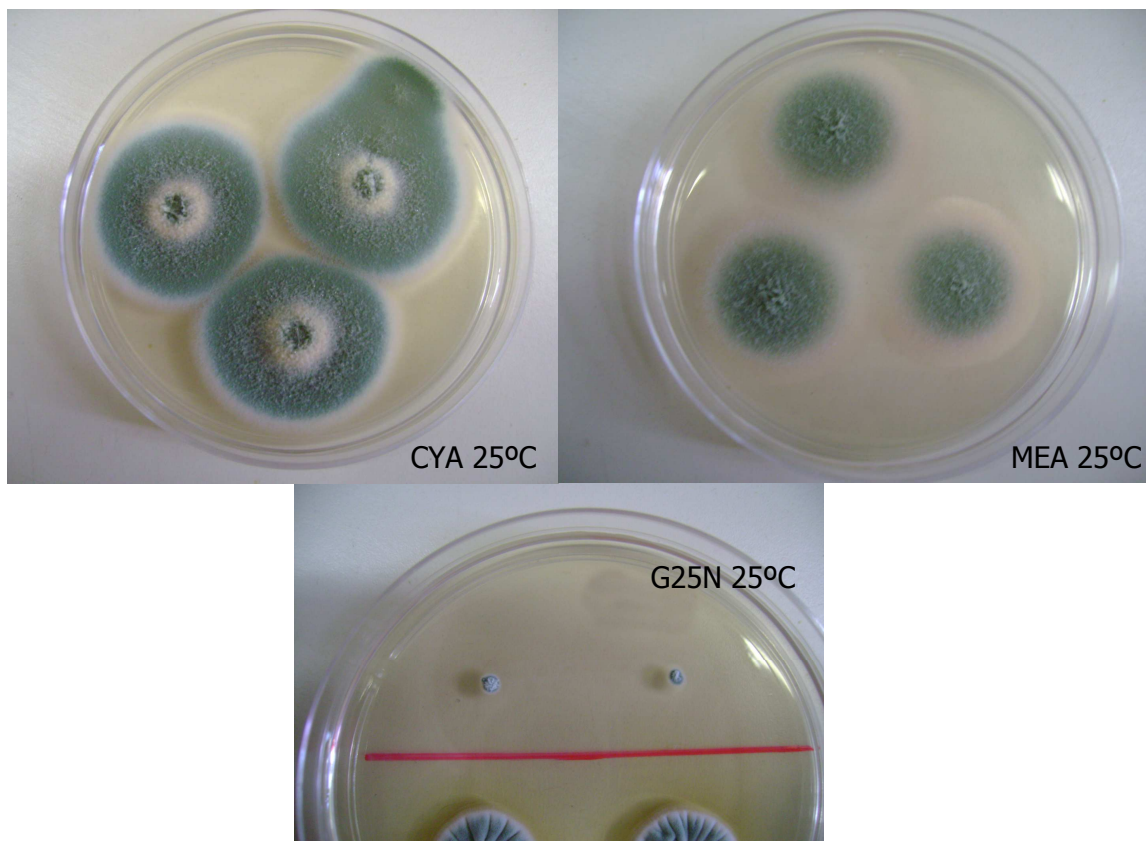
Prancha 11- Cleistotécio: estrutura característica de *Eurotium* sp. Estado teleomórfico do gênero *Aspergillus*.



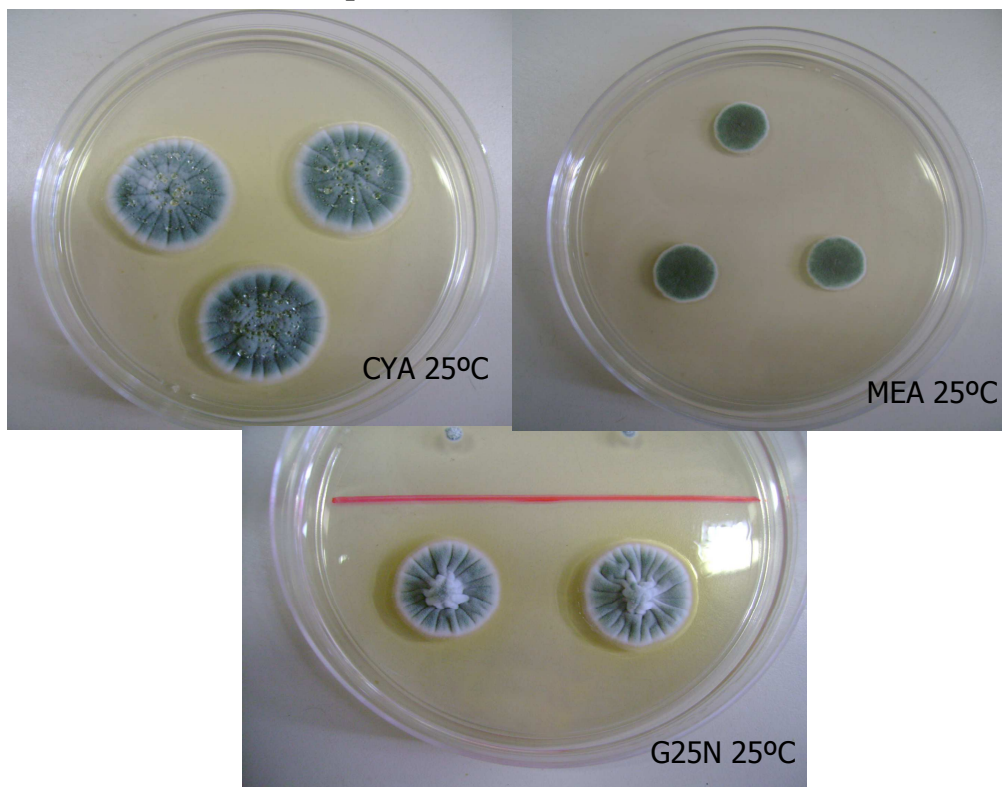
Prancha 12- Características macroscópicas de *Penicillium corylophilum* isolado de alimentos destinados à equinos.



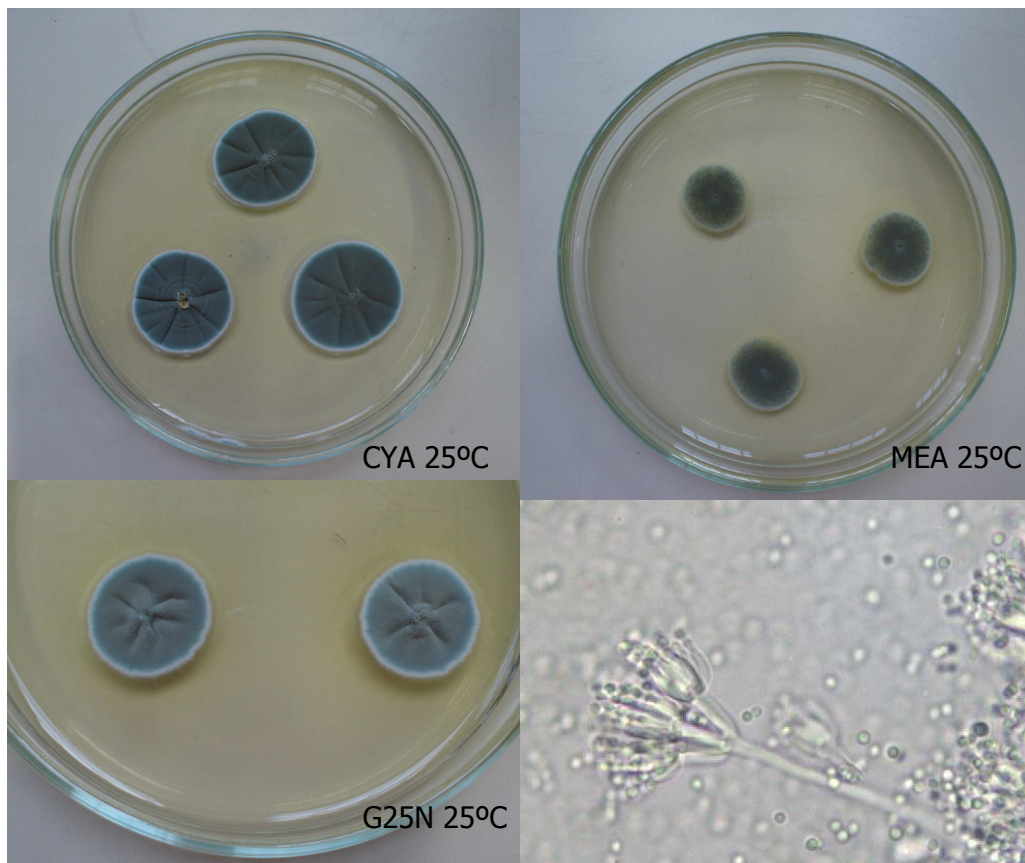
Prancha 13- Características macroscópicas de *Penicillium felutanum* isolado de alimentos destinados à equinos.



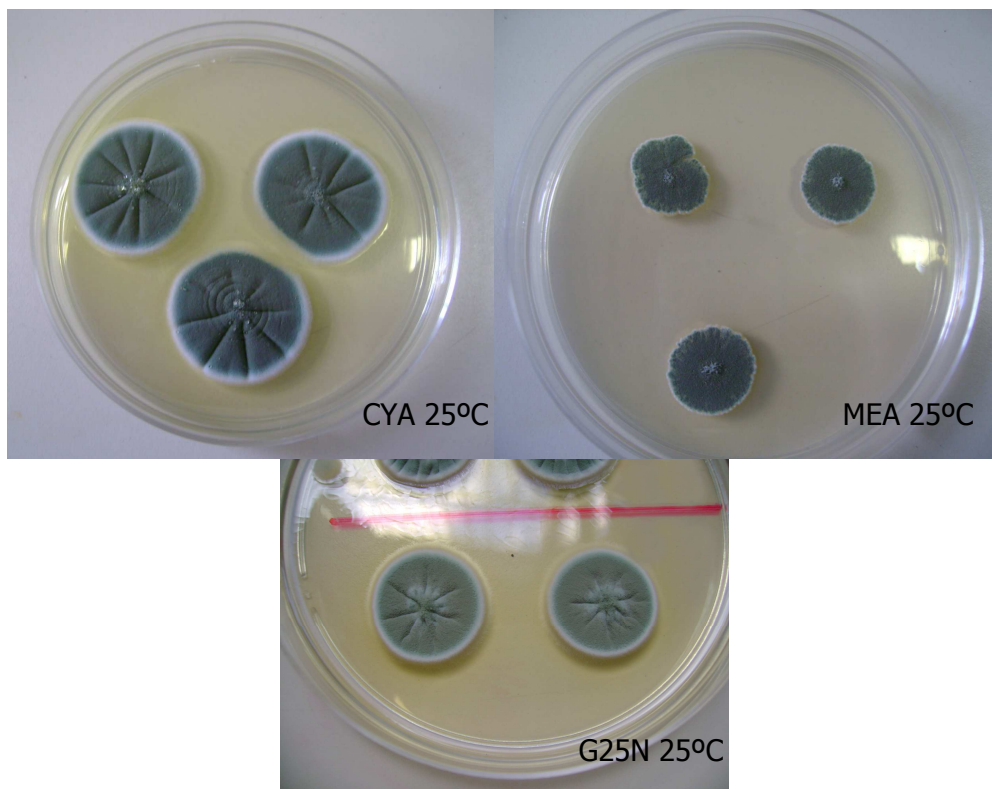
Prancha 14- Características macroscópicas de *Penicillium funiculosum* isolado de alimentos destinados à equinos.



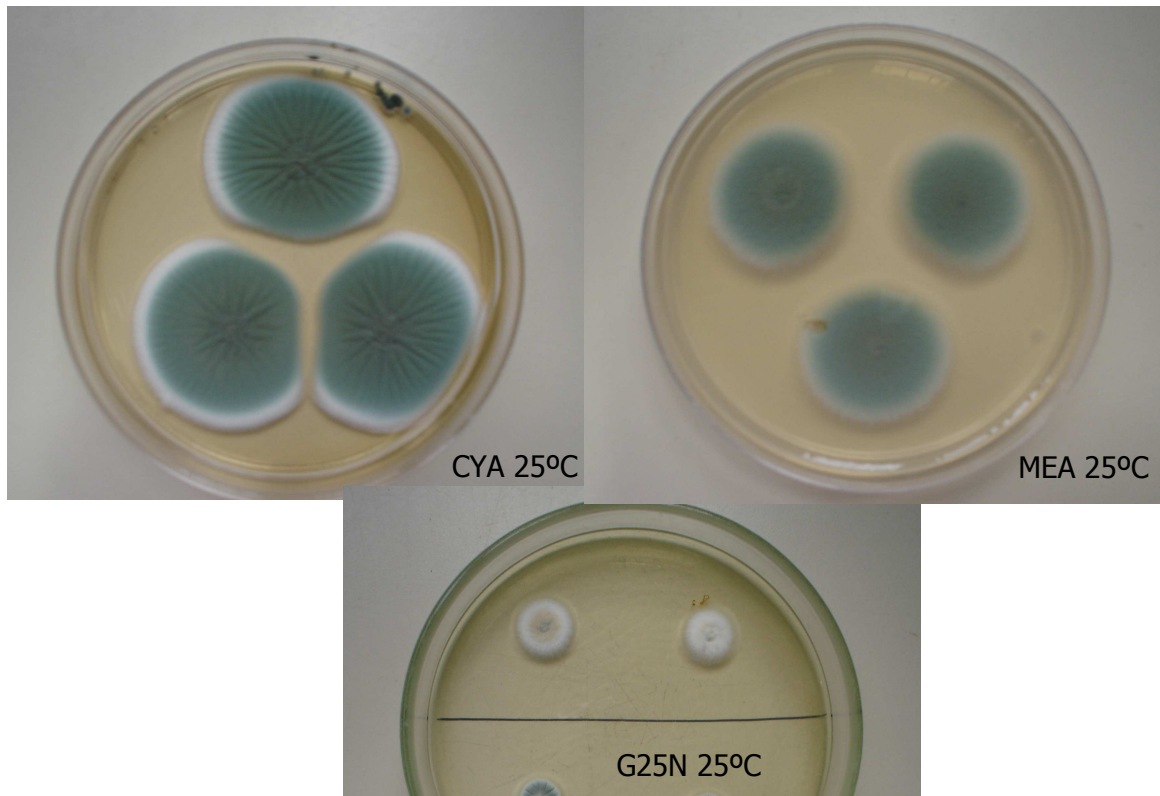
Prancha 15- Características macroscópicas de *Penicillium canescens* isolado de alimentos destinados à equinos.



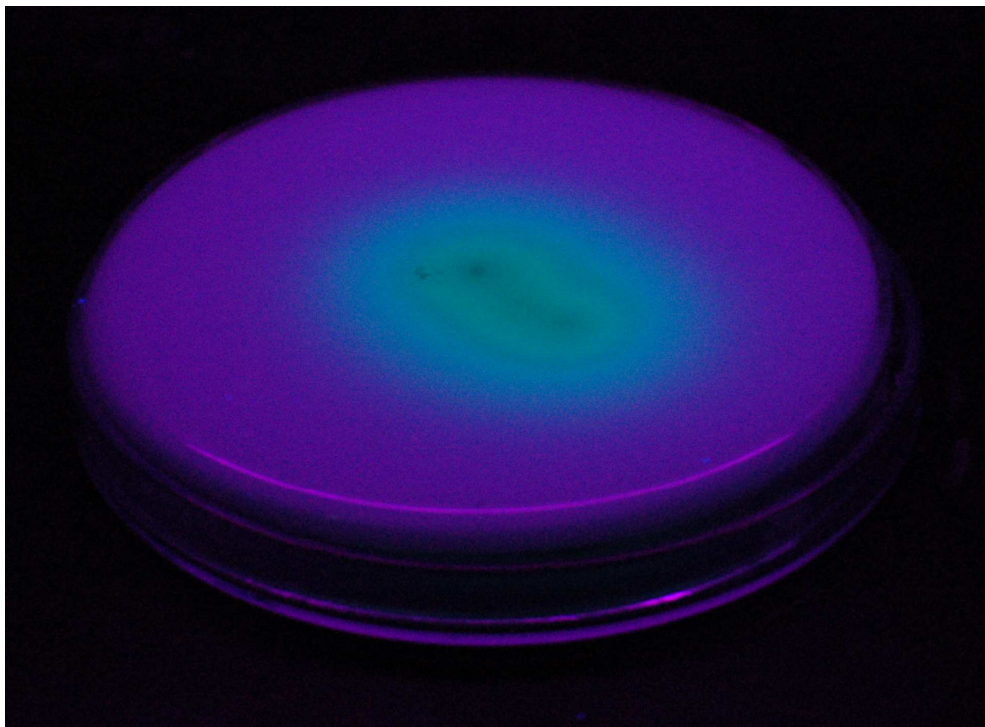
Prancha 16- Características macro e microscópicas de *Penicillium citrinum* isolado de alimentos destinados à equinos.



Prancha 17- Características macroscópicas de *Penicillium simplicissimum* isolado de alimentos destinados à equinos.



Prancha 18- Características macroscópicas de *Penicillium commune* isolado de alimentos destinados à equinos.



Prancha 19- Fluorescência azulada obtida a partir de uma cepa de *Aspergillus flavus*.