



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA

ANA GABRIELLE DA ROCHA E SILVA

**FUNGOS POTENCIALMENTE MICOTOXIGÊNICOS EM RAÇÕES PARA
ANIMAIS DOMÉSTICOS COMERCIALIZADAS EM SERRA TALHADA – PE**

SERRA TALHADA

2019

ANA GABRIELLE DA ROCHA E SILVA

**FUNGOS POTENCIALMENTE MICOTOXIGÊNICOS EM RAÇÕES PARA
ANIMAIS DOMÉSTICOS COMERCIALIZADAS EM SERRA TALHADA – PE**

Monografia apresentada como requisito integral ao grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Medeiros de Siqueira

SERRA TALHADA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca da UAST, Serra Talhada - PE, Brasil.

S586f Silva, Ana Gabrielle da Rocha e

Fungos potencialmente micotoxigênicos em rações para animais domésticos comercializadas em Serra Talhada - PE / Ana Gabrielle da Rocha e Silva. – Serra Talhada, 2019.

45 f.: il.

Orientadora: Virgínia Medeiros de Siqueira

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Unidade Acadêmica de Serra Talhada, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Alimentação dos animais. 2. Animais domésticos. 3. Micotoxinas. I. Siqueira, Virgínia Medeiros de, orient. II. Título.

CDD 574

FUNGOS POTENCIALMENTE MICOTOXIGÊNCOS EM RAÇÕES PARA ANIMAIS DOMÉSTICOS COMERCIALIZADAS EM SERRA TALHADA – PE

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como requisito obrigatório para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a Virginia Medeiros de Siqueira (ORIENTADORA)

UFRPE/UASt

Profa. Dra. Cynthia Maria Carneiro Costa (2º TITULAR)

UFRPE/UASt

Profa. Me. Ana Luiza da Silva (3º TITULAR)

UFRPE/UASt

Serra Talhada - PE

Janeiro de 2019

Dedico

À minha família pela paciência comigo
nos momentos de desespero e incentivo
nos momentos de angústia.

“Eu confio em mim. A dor nas minhas costas é para que minhas asas apareçam. Eu confio em você, e embora agora pareça humilde, você saltará para um futuro próspero!”

Outro: Wings – BTS

Agradecimentos

À Deus, pela vida e todas as coisas boas que me foram dadas!

À minha família, em especial minha mãe, pelo apoio e palavras de incentivos que me ajudaram a chegar até aqui.

À UFRPE/UAST pela vaga concedida bem como a oportunidade para realização desse trabalho.

Aos meus colegas de turma. Juntos, aprendemos a conviver e enfrentar nossas dificuldades. Levarei vocês comigo para sempre.

Ao PET Biologia/UAST pela bolsa concedida, mas mais do que isso, pela oportunidade de conviver e trabalhar com tantas pessoas incríveis, que me ajudaram a enfrentar meus medos e superar minhas dificuldades. Agradeço especialmente aos tutores Mauro de Melo Júnior e André Lima, por todos os ensinamentos, por acreditarem que tenho potencial, quando às vezes nem eu acreditava, e pela amizade.

À todos os petianos que passaram pelo grupo durante esses três anos, foi um prazer conhecer e trabalhar com vocês!

À professora Virgínia Medeiros pela orientação, inspiração e toda ajuda para que esse trabalho fosse concluído.

Ao grupo LAPEEMI, em especial Ruth Rodrigues e Gaby Miranda, por me receberem e me ensinarem os “primeiros passos” no laboratório.

Aos demais professores, pelos ensinamentos que se estendem além da sala de aula. Cada um de vocês me inspirou de alguma forma e fizeram esse momento possível.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

Obrigada!

RESUMO

Devido à grande criação de animais domésticos no mundo, aumentou-se também o mercado de produtos direcionados a esses animais, como as rações. Essas rações, por sua vez, podem estar sujeitas a contaminações microbianas, principalmente por fungos, que são microrganismos que podem causar deterioração no alimento ou produzir substâncias tóxicas como as micotoxinas, levando a prejuízos financeiros e, quando ingeridos, causando riscos à saúde do animal. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi isolar, quantificar e identificar os fungos filamentosos presentes em ração para cães e gatos, comercializadas em suas embalagens originais fechadas e a granel, no município de Serra Talhada/PE. Foram analisadas quatro amostras vendidas em embalagem fechada (duas para cães e duas para gatos) e quatro amostras comercializadas a granel (duas para cães e duas para gatos), utilizando dois diferentes métodos, o de diluição seriada e o de plaqueamento direto para determinação da quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de ração e o índice de contaminação, respectivamente. Todas as amostras apresentaram fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, com uma quantificação máxima de $36,7 \times 10^4$ UFC/g de fungos para ração comercializada em sua embalagem original, bem como para uma amostra de ração para gatos foi encontrado um índice de contaminação de 100 %. No geral, as rações vendidas em embalagens fechadas apresentaram maior quantidade de contagem de fungos do que as que eram comercializadas a granel, porém não houve diferença significativa entre as amostras, em conformidade com outros trabalhos. Não existe legislação brasileira que determine o limite máximo de colônias fúngicas por grama de ração, o que torna difícil classificar a amostra como segura ou não. Porém, a presença de *Aspergillus* e *Penicillium* em condições de baixa atividade de água pode indicar uma possível produção de micotoxinas nas rações. Assim, determina-se que a forma de comercialização não é o único fator que influencia na contaminação fúngica dos alimentos, embora ressalta-se, que as embalagens protegem os alimentos conservando suas características originais e tornando-os menos propensos a contaminações microbianas.

Palavras-chave: alimentação animal, índice de contaminação, micotoxinas, *pets*.

ABSTRACT

Due to the great domestic animal breeding in the world, the market of products directed to these animals, such as rations, has also increased. These feeds, in turn, may be subject to microbial contamination, mainly by fungi, which are microorganisms that can cause food deterioration or contamination by toxic substances such as mycotoxins, leading to financial losses and, when ingested, causing health risks to the animal. Thus, the objective of this work was to isolate, quantify and identify the filamentous fungi present in feed for dogs and cats commercialized in their original package and bulk containers in the municipality of Serra Talhada / PE. Four samples sold in their original package (two for dogs and two for cats) and four samples sold in bulk (two for dogs and two for cats) were analyzed using two different methods: serial dilution and direct plating for determination of quantity of Colony Forming Units (CFU) per gram of feed and the contamination index, respectively. All samples showed fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, with a maximum quantification of $36,7 \times 10^4$ CFU / g of fungi for feed marketed in their original packaging, as well as for one sample of cat food the contamination index was 100%. In general, rations sold in sealed packages had a higher amount of fungal counts than those sold in bulk, but there was no significant difference between the samples, according to other studies. In Brazil, there is no legislation that determines the maximum limit of fungal colonies per gram of feed, what makes it difficult to classify the sample as safe or not. However, the presence of *Aspergillus* and *Penicillium* under conditions of low water activity may indicate a possible production of mycotoxins in feed. Thus, it is determined that the form of commercialization is not the only factor that influences the fungal contamination of foods, although it is emphasized that the packaging protects the foods conserving their original characteristics and making them less prone to microbial contaminations.

Key-words: animal feed, contamination index, mycotoxins, pets.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Fungos filamentosos – características gerais.....	15
2.2 Fungos filamentosos osmofílicos em ração animal	16
2.3 Micotoxinas	19
2.4 Embalagens	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Coleta das amostras e estratégia amostral	25
3.2. Análises microbiológicas	26
3.3 Integração e análise dos dados	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
6. REFERÊNCIAS.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação e índice de contaminação por fungos em rações para cães e gatos comercializadas em embalagens originalmente fechadas no município de Serra Talhada, PE.....	29
Tabela 2. Quantificação e índice de contaminação por fungos em rações para cães e gatos comercializadas a granel (embalagens originais previamente abertas) no município de Serra Talhada, PE.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rações comercializadas em embalagens plásticas originais fechadas.....	23
Figura 2. Rações comercializadas em embalagens plásticas reembaladas.....	23
Figura 3. Rações comercializadas a granel em recipiente de vidro.....	24
Figura 4. Local de obtenção das amostras comercializadas em embalagens originais fechadas.	25
Figura 5. Local de obtenção das amostras comercializadas a granel.	26
Figura 6. Representação da técnica de Diluição Seriada.....	27
Figura 7. Representação da técnica de Plaqueamento Direto	27
Figura 8. Unidades Formadoras de Colônias obtidas por meio da técnica de diluição seriada das amostras comercializadas em embalagens originais fechadas.	42
Figura 9. Crescimento de fungos filamentosos a partir do plaqueamento direto de grãos de ração comercializadas em embalagens originais fechadas,.....	43
Figura 10. Unidades Formadoras de Colônias de fungos obtidas por meio da técnica de diluição seriada das amostras comercializadas a granel.	44
Figura 11. Crescimento de fungos filamentosos a partir do plaqueamento direto de ração comercializada à granel.....	45

1. INTRODUÇÃO

A domesticação de animais pelo Homem é datada de mais de 30 mil anos, sendo o cão registrado como o primeiro animal a ser domesticado (SCHWEIZER et al., 2018). Apesar desta relação de longa data, só nas últimas décadas dos séculos XX e XXI é que a criação de animais domésticos em residências, como cães, gatos, pássaros e peixes cresceu consideravelmente. Atualmente, estima-se que no Brasil existam 52,2 milhões de cães, 22,1 milhões de gatos domésticos (IBGE, 2013), o que inevitavelmente, associado ao estilo de vida contemporâneo, impulsiona um mercado de produtos direcionados aos chamados *pets*, incluindo aqui a produção de rações.

As rações, assim como outros alimentos processados e armazenados, estão suscetíveis a contaminações microbianas, desde a produção da matéria prima no campo, até no armazenamento e comercialização das mesmas. Os fungos, por exemplo, são microrganismos que podem estar presentes nos alimentos e trazer malefícios e prejuízos financeiros quando deteriorantes ou produtores de toxinas (CRUZ, 2010).

Apesar de estar presente nos alimentos há um longo tempo, foi em 1960, quando a doença conhecida como “Turkey X” levou à morte mais de 100.000 perus na Inglaterra, que os fungos presentes em alimentos estocados obtiveram a devida importância (PITT; HOCKING, 2009). Desde então outros surtos relacionados às rações contaminadas já foram relatados, inclusive em animais domésticos, com consequentes prejuízos financeiros (GUTERRES et al., 2017; WOUTERS et al., 2013; ROSA et al., 2002).

Dentre os contaminantes fúngicos, destacam-se aqueles potenciais produtores de micotoxinas, que são metabólitos secundários que apresentam efeitos tóxicos e que, ao serem ingeridas por animais ou humanos, podem causar doenças hepáticas, renais e formação de tumores, e até levar à morte (SANTURIO, 2007). Existem mais de 500 tipos de micotoxinas conhecidas, sendo as principais as aflatoxinas, ocratoxinas e fusariotoxinas, por apresentarem grande potencial de toxicidade. Os gêneros de fungos mais frequentemente associados à produção de micotoxinas são *Aspergillus* e *Penicillium* (MUZOLON, 2008). As aflatoxinas são produzidas pelos fungos do

gênero *Aspergillus* e podem causar danos no fígado, má formação embrionária e diminuir as funções imunológicas. Podem estar presentes em grãos, principalmente milho, que é matéria prima para muitas rações de cães, que são considerados um dos animais mais suscetíveis ao efeito destas toxinas. Embora as aflatoxinas sejam as mais estudadas, por serem as mais comuns, outras micotoxinas também causam danos a esses animais e devem ser estudadas para evitar futuras contaminações (MALLMANN et al., 2009).

Os fungos osmofílicos são capazes de se desenvolver em substratos com atividade de água (a_w) abaixo de 0,85, assim, são frequentemente encontrados em rações para animais domésticos, uma vez que essas rações costumam apresentar valores de a_w entre 0,60 e 0,85 (COPETTI, 2005). Essa atividade de água é a quantidade de água “livre” encontrada no alimento e favorece o desenvolvimento de microrganismos e reações de deterioração do próprio alimento (DITCHFIELD, 2000).

O Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece um limite de 50 $\mu\text{g/Kg}$ para quantidades de aflatoxinas em ração animal (BRASIL, 2002), porém não existe no Brasil nenhum limite estabelecido para a quantidade de fungos filamentosos por grama de ração. Desta forma, este trabalho objetivou o isolamento, quantificação e identificação de fungos filamentosos em rações para cães e gatos comercializadas no município de Serra Talhada, visando trazer informações importantes sobre quais gêneros de fungos predominam em determinadas rações e se a forma de armazenamento e comercialização (por exemplo, a granel) interfere nesta quantificação. Os resultados obtidos podem auxiliar na elaboração de medidas de controle de contaminação fúngica e, conseqüentemente, de contaminação por micotoxinas em rações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos filamentosos – características gerais

Os fungos filamentosos são assim chamados porque têm o seu corpo constituído de filamentos tubulares microscópicos chamados de hifas, compostas por múltiplas células e cujo conjunto forma o micélio; este pode sofrer diferenciação e desenvolver estruturas reprodutivas ou ainda permitir sua fixação no substrato e nutrição (BOSSOLAN, 2002). Esse micélio pode apresentar colorações diversas, devido à presença de esporos assexuados ou produção de pigmentos, que auxiliam na identificação de gêneros e espécies (BORGES et al, 2002).

As hifas são classificadas como septadas, quando apresentam paredes transversais como no filo Ascomycota, e cenocíticas, quando apresentam septos apenas separando estruturas vegetativas das reprodutivas, a exemplo dos filamentos Chytridiomycota e Glomeromycota (LEITE; ESPOSITO, 2010).

O reino Fungi é atualmente dividido em quatro Filos denominados Chytridiomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota (HIBBETT et al. 2007). Esta classificação é baseada em análise filogenética molecular, porém as estruturas reprodução sexuada (zigósporos, oósporos, ascósporos e basidiósporos) têm grande importância na taxonomia clássica dos fungos. Alguns fungos não têm reprodução sexual como os fungos mitospóricos, e por isso são comumente chamados de fungos imperfeitos, sendo colocados, geralmente, dentro de Ascomycota e Basidiomycota (MAIA; CARVALHO JÚNIOR, 2010).

Os fungos vão produzir estruturas de esporulação quando houver uma redução de nutrientes disponíveis no ambiente em que se encontram, entretanto, se o ambiente oferece condições adequadas, haverá apenas o crescimento somático do organismo (LEITE; ESPOSITO, 2010). Os esporos produzidos podem ter função de reprodução, dispersão e sobrevivência do fungo, por isso muitos deles produzem mais de um tipo de esporo.

São capazes de se desenvolver nos mais diversos tipos de ambiente, como no solo, matéria orgânica e água (SILVA, 2008); têm alto poder de adaptação e, conseqüentemente, capacidade de crescer em substratos em condições

diversas, como atividade de água reduzida (entre 0,65 e 0,99); pH abaixo de 3,0; temperaturas entre 0°C e 40°C; e capacidade de esporulação e disseminação em diferentes condições (SILVA, 2008), permitindo sua proliferação. Os fungos também estabelecem diferentes relações com o ambiente e com outros seres vivos, podendo ter o hábito saprofítico, de parasitismo, simbiote e até mesmo de predação.

Deve-se lembrar que fatores como pH, temperatura, umidade e disponibilidade de oxigênio influenciam diretamente no crescimento fúngico, o que influencia no seu *habitat*, e apesar de poder ser encontrado nos mais diversos ambientes, os principais locais em que habitam são o solo, água e no interior de vegetais (MACCHERONI JÚNIOR; ARAÚJO; LIMA, 2010).

Eles também podem ser encontrados em ambiente extremos como em regiões polares, onde crescem em temperaturas de 0°C, ou regiões quentes, cujas temperaturas chegam a 55°C. Há ainda os fungos halofílicos que se desenvolvem em ambientes com salinidade superior à encontrada em ambientes marinhos. Também são encontrados em ambientes ácidos e com grandes concentrações de metais pesados, e até deteriorantes de concreto (MACCHERONI JÚNIOR; ARAÚJO; LIMA, 2010).

Além da importância ecológica e medicinal dos fungos, esses microrganismos são, atualmente, utilizados em diferentes abordagens frente aos desafios encontrados mundialmente. Suas aplicações envolvem promover o crescimento de plantas cultivadas aumentando sua absorção de nutrientes, podem ser utilizados no controle biológico, na indústria alimentícia, e são constantes fontes de pesquisa para o desenvolvimento de drogas antimicrobianas, biocombustíveis e recuperação de ambientes degradados (LANGE, 2014).

2.2 Fungos filamentosos osmofílicos em ração animal

Fungos osmofílicos são aqueles capazes de se desenvolver em atividade de água (a_w) inferior a 0,85 mesmo que não sejam capazes de se desenvolver em toda condição de pH, temperatura, potencial redox e outros fatores de crescimento (PITT, 1996). Essa atividade de água reflete a quantidade de água livre disponível, ou seja, aquela que não está nas ligações químicas ou na

dissolução do soluto (SILVA et al, 2015), pois a água presente no alimento pode estar ligada ao substrato ou apresentar-se de forma livre.

Atividade de água é diferente de umidade, pois enquanto a atividade de água avalia a quantidade de água livre que é suscetível a diversas reações, a umidade mede o percentual de toda a água disponível no alimento, tanto livre quanto ligada. Assim, essa quantidade de água que não está ligada ao substrato fica disponível para as reações físicas químicas e biológicas (GARCIA, 2004).

Os fungos osmofílicos (também chamados de xerofílicos) são considerados moderados quando possuem capacidade de crescer em a_w abaixo de 0,85, mas não necessitam de um meio específico para crescimento. Assim são os fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Eurotium*, todos relacionados à produção de micotoxinas (SILVA et al., 2015).

A fim de produzir alimentos com maior durabilidade, as indústrias alimentícias costumam reduzir a atividade de água e pH, realizar um tratamento térmico e usar agentes antimicrobianos. As rações animais pertencem ao grupo de alimento com disponibilidade intermediária de atividade de água com valores de a_w entre 0,60 e 0,85 e pH variável (COPETTI, 2005). Com esses tratamentos é possível controlar a presença de bactérias, entretanto, como os fungos osmofílicos são capazes de se desenvolver sob essas condições, as rações ficam sujeitas às contaminações fúngicas que, por sua vez, permitem a contaminação da ração por micotoxinas (COPETTI, 2005).

Entretanto, a presença do fungo na ração não significa, necessariamente, que haja produção de micotoxinas, da mesma forma, a micotoxina pode estar presente sem haver a presença do fungo. Isso é devido ao fato de que a maioria das micotoxinas são termoestáveis, e resistem a diversos tratamentos térmicos ou processos de desidratação, que destroem o fungo que as produziu mas não a micotoxina (MAZIEIRO; BERSOT, 2010). Além de se desenvolverem nessas condições, os fungos presentes nas rações têm ainda capacidade de suportar baixas quantidades de oxigênio, conseguindo sobreviver em quantidades de até 0,2%. Quantidades inferiores a esta, só são alcançadas em embalagens hermeticamente fechadas (DA ROCHA et al., 2010).

Há trabalhos que comprovam a presença de fungos filamentosos em rações como o de Hillmann et al. (2015), que investigaram a presença de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* em rações para cães e gatos comercializadas a granel e em embalagem fechadas. Eles verificaram que *Aspergillus* estava presente em todas as amostras, *Penicillium* esteve presente em 33% das amostras, e *Fusarium* em 16,6%. Nesse trabalho a quantidade de fungos isolados foi maior nas rações comercializadas em embalagens fechadas (HILLMANN et al, 2015).

Mendes et al (2014) realizaram um trabalho em que simulava a venda a granel de duas rações (uma para cão e uma para gato) deixando-as expostas ao meio ambiente por 60 dias e comparando com duas amostras (uma para cão e uma para gato) que permaneceram em suas embalagens originais fechadas. Percebeu-se nesse caso que a quantidade de fungos filamentosos foi maior nas rações expostas ao ambiente e, houve maior predominância dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (MENDES et al, 2014).

A presença desses gêneros em rações para *pets* pode ser observada também em trabalhos internacionais como o realizado por Singh e Chuturgoon, em 2017, que analisaram 20 rações vendidas em supermercados, *pet stores* e redes de veterinários na África do Sul. Em todas as amostras foram identificados fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, embora tenham predominado as espécies: *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. parasiticus*, além da presença de micotoxinas do tipo aflatoxinas e fumosinas (SINGH; CHUTURGOON, 2017).

Em 2001, Bueno, Silva e Oliver analisaram a presença de fungos filamentosos de 21 amostras de rações (12 para cães e 9 para gatos) de 8 marcas no total, produzidas e importadas na Argentina. Nessas amostras foram encontradas 77 cepas pertencentes a 10 gêneros, sendo os de mais frequência *Aspergillus* com 62% de ocorrência, *Rhizopus* com 48% e *Mucor* com 38%, os gêneros *Penicillium* e *Fusarium* apareceram com menor frequência (BUENO; SILVA; OLIVER, 2001).

Em Portugal, em 2003, foi realizado um estudo que obteve resultados semelhantes a partir da análise de 60 amostras de rações (20, para cães, 20 para gatos e 20 para pássaros domésticos). Apesar do baixo nível de contaminação encontrado nas rações, as que apresentaram crescimento

fúngico tiveram maior ocorrência de *Aspergillus* (58,3%) seguidos por *Penicillium* e *Mucor* (38,3%), além de ser detectada a presença de micotoxinas nas rações para cães (MARTINS; MARTINS; BERNARDO, 2003).

Apesar da presença do fungo não indicar necessariamente uma contaminação também pela micotoxina, estudos apontam que há uma correlação direta entre a atividade de água do alimento/temperatura/presença do fungo com a presença da toxina fúngica (PACHECO et al., 2010). Apesar do risco potencial da presença desses microrganismos em alimentos, no Brasil não existe uma legislação específica que limite a quantidade de contagem de fungos em rações para animais. Em outros países, como na Suíça, esse limite é de 10^6 UFC/g (Unidade Formadora de Colônia por grama) segundo a GMP – *Specific Feed Safe Standards* (2017).

2.3 Micotoxinas

Os fungos têm sido associados às doenças humanas há muito tempo, como na Idade Média quando surgiu uma doença conhecida com Ergotismo, principalmente na França. Após o aumento do uso de centeio na Europa percebeu-se o aparecimento de doenças e redução de fertilidade, que estavam associados à exposição do esporão do centeio, que foi reconhecido pelo micologista Louis Tulasne (1815 – 1885) como resultado de uma infecção pelo fungo *Claviceps purpurea* (PITT; MILLER, 2017).

Essa associação foi provada em 1630 pelo médico Dr. Thuillier, na França, que observou que a gravidade dos sintomas era proporcional ao consumo dos grãos de centeio contaminados, e que pessoas que se alimentaram de uma maior variedade de grãos sofreram menos (PITT; MILLER, 2017). O ergotismo também ficou conhecido como “fogo de Santo Antônio”, pois se acreditava que uma peregrinação ao santuário de Santo Antônio aliviaria as sensações de queimação que eram sentidas. Hoje, sabe-se que o ergotismo é uma intoxicação causada pela ingestão da ergotina, micotoxina produzida por *C. purpúrea* e que causa sintomas de depressão, confusão mental, hipertensão, bradicardia, perda de consciência, cefaleia, cianose periférica (mãos e pés pálidos), podendo ainda levar ao coma e morte (MEDEIROS et al., 2012)

Em 1960, houve na Inglaterra a morte de 100.000 perus. O exame pós-morte revelou inflamação no intestino e no fígado sugerindo envenenamento, fato que ficou conhecido como “turkey X disease”, visto que não se sabia a causa do surto (HOMEI; WORBOYS, 2013). Após a investigação do caso, descobriu-se que os perus tinham se alimentado de ração contendo amendoim contaminado por metabólitos secundários produzidos pelo fungo do gênero *Aspergillus* (MEDEIROS et al, 2012).

Metabólitos secundários são substâncias produzidas por plantas e microrganismos que não são essenciais para seu crescimento e reprodução. Esses metabólitos são produzidos quando há uma grande quantidade de metabólitos primários e são codificados por genes geralmente organizados em *clusters*, que incluem genes que codificam as enzimas biossintéticas, genes para resistência à ação tóxica do próprio metabólito, e genes para a secreção dos metabólitos produzidos (MARTÍN; CASQUEIRO; LIRAS, 2005).

A maioria desses metabólitos serve como comunicação entre o organismo produtor e outros seres que vivam ao redor como outros microrganismos (MARTÍN; CASQUEIRO; LIRAS, 2005), e também como hormônios sexuais, agentes de simbiose, como competição e efetores de diferenciação (DEMAIN; ADRIO, 2008).

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos exclusivamente por espécies de fungos filamentosos, que podem contaminar produtos agrícolas e causar doenças ou até a morte em animais e humanos. Essas intoxicações causadas por micotoxinas são chamadas de micotoxicoses (ATANDA et al., 2011).

Desde 1960, quando as micotoxinas foram descobertas, inúmeras pesquisas foram feitas a fim de entender como ocorrem essas contaminações. Entretanto, é difícil estimar as consequências causadas pelas micotoxinas porque elas podem ocorrer em baixas concentrações, o que dificulta sua detecção; quando os sinais de micotoxicoses aparecem, geralmente, o produto já foi totalmente consumido; além disso, os sintomas da micotoxicoses são comumente confundidos com os de outras doenças mais comuns (JOBIM et al., 2001).

A produção das micotoxinas pode ser influenciada por fatores ambientais, dependendo então da localização geográfica e dos métodos de produção e armazenagem dos grãos (ADEYEYE, 2016). Ocorrem com frequência em milho e amendoim, que são comumente utilizados como matéria-prima na fabricação de rações (ZAKI et al., 2012).

Dentre as centenas de micotoxinas conhecidas, as mais estudadas, devido maior número de ocorrência, são as aflatoxinas e fumonisinas. As aflatoxinas, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus*, são um grupo de toxinas cujas principais são B1, B2, G1, G2 que são classificadas baseadas na cor da fluorescência emitida sob luz ultravioleta (*blue* ou *green*). Essas micotoxinas tem a capacidade de se ligar ao DNA, afetando a síntese proteica, além de ter propriedades carcinogênicas e imunossupressoras (FREIRE et al, 2007).

As fumonisinas foram isoladas primeiramente de *Fusarium moniliforme*, são encontradas naturalmente em milho e, na maioria dos animais, pode causar danos hepáticos e renais, compromete a função imunológica e causa perda de peso. Essas toxinas são resistentes ao processamento do alimento, uma vez que são termoestáveis e não são degradadas durante a fermentação (ZAKI et al, 2012).

Dentre estas, as aflatoxinas, são as mais estudadas tanto por serem as mais comuns, quanto pelo seu alto grau de toxicidade (IAMANAKA et al. 2010). Esse grupo de fungos (*Aspergillus* spp.) é comumente encontrado na indústria de alimentos, uma vez que são fungos deteriorantes, e crescem em baixa atividade de água (ADEYEYE, 2016). Dentre as aflatoxinas, a Aflatoxina B1 (AFB1) é a mais tóxica e tem efeito carcinogênico (IAMANAKA et al. 2010). Em animais, a aflatoxicose causa falta de apetite, perda de peso, anormalidade neurológica, icterícea da membrana mucosa, diarreia sanguinolenta, convulsões e morte (HILLMANN et al., 2015).

Esses efeitos podem ser comprovados pelo estudo de Newman et al. (2007), avaliaram nove cães que tinham se alimentado de ração contaminada com aflatoxina, no estado do Tennessee, EUA. Os animais apresentaram depressão, dores abdominais, diarreia, vômito, anorexia, icterícia. Apesar do tratamento nenhum animal sobreviveu (quatro morreram e cinco passaram por eutanásias), e todos apresentaram danos no fígado (NEWMAN et al, 2007).

Um estudo feito por Wouters et al., em 2013, ressalta os efeitos da aflatoxina B1 em cães através de alimento contendo milho contaminado. Nesse estudo 65 cães, de nove fazendas diferentes no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, consumiram alimentos cujo ingrediente comum era o milho, que estava contaminado com aflatoxina. Dentre esses animais 60 vieram a óbito, com os mesmos sintomas do estudo anterior, além de fibrose hepática e degeneração dos hepatócitos (WOUTERS et al, 2013).

Guterres et al. (2017), relataram um surto de aflatoxicose aguda que ocorreu na cidade Pelotas/RS, devido a ingestão de quirelas de milho e arroz contaminado, atingindo 18 cães dos quais apenas um não veio a óbito. Foi observado na autópsia a degeneração e necrose hepática severa.

A contaminação das rações por micotoxinas deve ser evitada em todo o seu processo de fabricação, desde a colheita e armazenamento até o processamento da ração, para que se possa proporcionar uma alimentação de qualidade, e sem riscos à saúde dos animais.

2.4 Embalagens

As embalagens são fundamentais para manter um alimento de qualidade, pois ajuda a retardar a deterioração dos mesmos, aumenta o tempo de vida útil do produto na prateleira, oferecendo proteção contra riscos físicos, químicos e biológicos (MARSH; BUGUSU, 2007). Além de oferecer proteção ao alimento, o material da embalagem pode influenciar nas características do mesmo.

A influência da embalagem na qualidade química e biológica de rações secas para cães e gatos pôde ser verificada, por exemplo, quando duas amostras de ração (uma para cão e uma para gato), retiradas da embalagem original e expostas ao ambiente por sessenta dias, a fim de simular a venda a granel foram analisadas. Os autores compararam essa análise com outras duas amostras que permaneceram em suas respectivas embalagens. Constatou-se que as rações que foram expostas ao ambiente apresentaram alterações na composição da ração, uma vez que o contato com o oxigênio atmosférico pode oxidar os lipídios presentes, causando odores e sabores desagradáveis, tornando o produto inconsumível. O valor da atividade de água

(a_w) também aumentou em proporção ao tempo de exposição, o que propiciou uma maior deterioração do alimento devido a presença de fungos e bactérias (MENDES et al, 2014).

Normalmente, as rações são comercializadas em embalagens plásticas (Figura 1 e 2) devido ao custo e facilidade na produção, entretanto, essas embalagens possibilitam uma permeabilidade quanto à luz, gases, vapores e moléculas de baixo peso molecular (MARSH; BUGUSU, 2007) que podem influenciar na qualidade dessas rações.

Figura 1. Rações comercializadas em embalagens plásticas originais fechadas.



Figura 2. Rações comercializadas em embalagens plásticas reembaladas.



Ocasionalmente, rações comercializadas a granel podem estar dispostas em *containers* de vidro (Figura 3), e oferece vantagens como ser impermeável a gases e vapores, mantém o produto fresco por mais tempo, embora seja pesado e tenha um custo mais elevado de transporte (MARSH; BUGUSU, 2007).

Figura 3. Rações comercializadas a granel em recipiente de vidro.



É importante ressaltar que as embalagens nos alimentos também os protegem de outros microrganismos patogênicos. Um trabalho feito por Girio et al. (2012), também não encontrou diferença significativa do número de fungos filamentosos e leveduras entre rações para cães comercializadas a granel e em embalagem fechada, porém, foram encontradas uma maior quantidade de microrganismos indicadores de contaminação fecal nas amostras comercializadas a granel, ficando a preocupação com a qualidade das rações comercializadas dessa forma (GIRIO et al, 2012).

As rações vendidas a granel também estão sujeitas a presença de insetos que podem ser veiculadores de microrganismos. Em 20 amostras de rações comercializadas a granel, todas apresentaram contaminação fúngica e das mesmas também foram isolados insetos das rações, dos quais *Sitophilus zeamais* (gorgulho) foi o mais frequente, e estava associado a fungos dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium*, além de *Aspergillus terreus* e leveduras.

Outras espécies de insetos também foram encontradas e estavam associadas à *Aspergillus flavus* (AQUINO; POTENZA, 2013).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras e estratégia amostral

Foram analisadas amostras de diferentes marcas de ração seca para cães e gatos, vendidas sob diferentes condições e locais na cidade de Serra Talhada, PE. Os locais de comercialização e marcas das rações foram escolhidos aleatoriamente. Em cada local, foram compradas quatro amostras vendidas a granel em *container* aberto e quatro amostras vendidas em suas embalagens originais e que estavam íntegras, totalizando oito amostras. De cada grupo de quatro amostras, dois foram rações para cães, e dois foram rações para gatos. As amostras vendidas a granel foram retiradas com um utensílio de metal e postas em um saco plástico. As amostras foram identificadas quanto ao local e embalagem de venda, enumeradas e estocadas de acordo com as condições indicadas para cada uma.

Na coleta, também foram observadas e anotadas características como a presença de insetos, temperatura do local, incidência de luz solar, local de armazenamento (prateleiras, chão ou armários), dentre outras (Figura 4 e 5). Quando possível, também foram anotadas informações sobre as rações, incluindo data de fabricação, data de validade, valor nutricional e atividade de água.

Figura 4. Local de obtenção das amostras comercializadas em embalagens originais fechadas.



Figura 5. Local de obtenção das amostras comercializadas a granel.



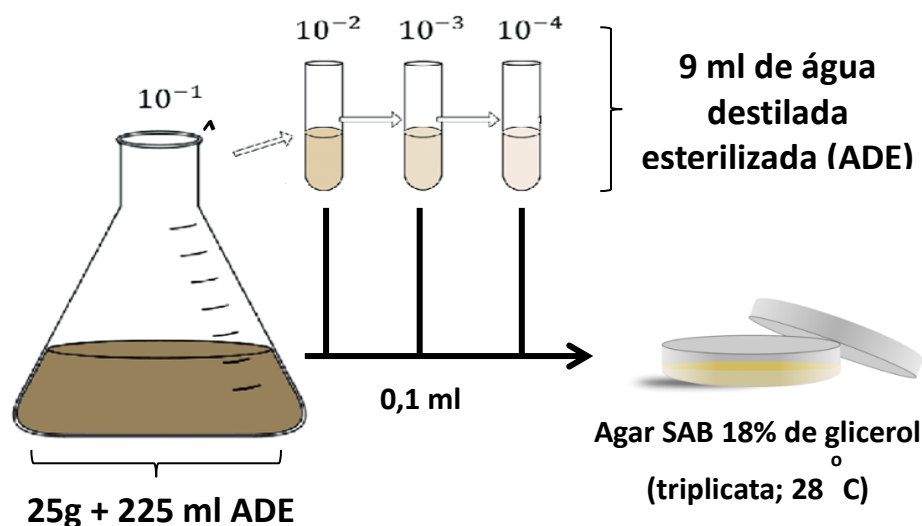
Uma vez coletadas, as amostras foram imediatamente transportadas para o Laboratório de Microbiologia da UAST onde foram submetidas às análises microbiológicas descritas a seguir.

3.2. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas constaram do isolamento e quantificação de fungos osmofílicos, ou seja, aqueles com habilidade em se desenvolver em substratos com baixa atividade de água.

Para tal, foram pesados assepticamente 25 gramas de cada amostra que foram reidratadas em 225 mL de água destilada esterilizada, sendo esta a primeira diluição (10^{-1}); a partir desta diluição, foi realizada a diluição seriada transferindo um mL para tubos de ensaio contendo nove mL de água destilada esterilizada 0,1% e assim sucessivamente até a diluição 10^{-4} . De cada diluição, foi transferido 0,1 mL para o meio de cultura Agar Sabouraud com glicerol 18% em placas de Petri e espalhadas em toda a superfície com o auxílio de uma alça de Drigalsky (Figura 6). Esta concentração de glicerol diminui a atividade de água do meio de cultura permitindo o isolamento de fungos osmofílicos (HOCKING & PITT, 1980).

Figura 6. Representação da técnica de Diluição Seriada



As placas de Petri foram incubadas a 28°C por 5 a 7 dias e examinadas para a presença de fungos filamentosos osmofílicos. Placas que apresentaram de 10 a 100 colônias foram selecionadas para isolamento e enumeração de fungos. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC/g). Todas as análises foram feitas em triplicata sob condições de esterilidade.

Também foi realizada a determinação do índice de contaminação fúngica a partir do plaqueamento direto (Figura 7) dos grãos das rações na superfície do meio de cultura Agar SAB 18% de glicerol. Foram transferidos assepticamente de 5 a 10 grãos de cada ração (a depender do tamanho) para a superfície do meio de cultura, num total de 25 grãos por amostra. O índice de contaminação foi calculado pelo número de grãos com crescimento fúngico/número total de grãos $\times 100$.

Figura 7. Representação da técnica de Plaqueamento Direto



Para identificação dos gêneros dos fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* foram utilizadas chaves de identificação para características micro e macroscópicas das colônias.

3.3 Integração e análise dos dados

As contagens de fungos foram realizadas através da Análise de Variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de significância 5%, através do programa “Microsoft Excel 2010”.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras contidas em embalagem originalmente fechadas foram analisadas, sendo duas para cães (C1 e C2) e duas para gatos (G1 e G2); todas possuíam a classificação *Premium* na embalagem indicando que possuíam algum aditivo antioxidante com atividade antifúngica.

Quando as amostras foram analisadas por meio da técnica de diluição seriada (Figura 8 - ANEXO), foi constatado um maior número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de fungos na amostra C2, com um máximo de $36,7 \times 10^4$ UFC por grama de ração analisada (Tabela 1). Este resultado também reflete no índice de contaminação desta mesma amostra, que atingiu 92 % nos grãos analisados.

Quando comparadas as quantificações de UFC na menor diluição das amostras comercializadas em suas embalagens originais (Tabela 1), verificou-se que amostra G1 apresentou a maior quantificação, chegando a 100 UFC/g. esta mesma amostra apresentou as maiores quantificações quando analisadas todas as diluições, bem como um índice de contaminação de 100 % dos grãos analisados. As rações para gatos possuem um maior percentual de proteínas (34% na amostra G1) quando comparadas às rações para cães (21% em C1 e C2), o que pode justificar o alto índice de contaminação por fungos nesta amostra.

Os índices de contaminação obtidos por meio do plaqueamento direto dos grãos (Figura 9 - ANEXO) foram de 76% e 92% para as rações destinadas a cães e de 100% e 86 % para as rações destinadas a gatos. Tratando-se de rações comercializadas em suas embalagens originais, os resultados obtidos apontam um alto índice de contaminação das mesmas, porém, não há limites estabelecidos no Brasil para a quantificação de fungos osmofílicos nestes tipos de amostras; a legislação brasileira padroniza para rações apenas o limite máximo de Aflatoxinas (50 µg/g). Portanto, este cenário torna difícil a conclusão do real risco que estas quantidades de fungos representam, porém, este risco não pode ser excluído.

Tabela 1. Quantificação e índice de contaminação por fungos em rações para cães e gatos comercializadas em embalagens originalmente fechadas no município de Serra Talhada, PE.

Amostra	Quantificação de fungos (UFC/g) por diluição				IC	Presença de <i>Aspergillus</i>	Presença de <i>Penicillium</i>
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴			
C1	33	6,7 x 10 ²	0	3,3 x 10 ⁴	76%	Sim	Sim
C2	33	1 x 10 ³	3,3 x 10 ³	36,7 x 10 ⁴	92%	Sim	Sim
G1	100	2,67 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	4,67 x 10 ⁴	100%	Sim	Sim
G2	33	6,7 x 10 ²	3,3 x 10 ³	3,3 x 10 ⁴	86%	Sim	Sim

IC = Índice de Contaminação; UFC = unidades formadoras de colônias; C1 e C2 = ração para cães; G1 e G2 = ração para gatos; os valores estão expressos pelas médias das triplicatas de cada diluição.

Por outro lado, em todas as amostras foi observado o crescimento de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Tabela 1), estes presentes e isolados de um substrato com baixa disponibilidade de água (rações secas), o que já torna um indicativo da capacidade destes fungos em produzir micotoxinas (PARDO et al., 2004).

A presença desses gêneros pode ser justificada pelo fato de que as espécies de *Aspergillus* são contaminantes frequentemente encontrados na etapa pós-colheita, podendo estar presentes também no processamento e manipulação dos grãos (KOCSUBÉ et al., 2013). Sua presença nas rações

indica um fator de risco já que é um produtor de micotoxinas cujas principais são as aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas e patulinas (VARGA et al., 2015). Dentre estas as aflatoxinas são as mais destacadas pelos pesquisadores, com a aflatoxina B1 sendo encontrada com mais frequência e conhecida como a micotoxina com maior potencial carcinogênico do fígado (SWEENEY; DOBSON, 1998).

Já o gênero *Penicillium* possui mais de 100 espécies produtoras de micotoxinas, produzindo principalmente ocratoxinas, patulinas e citrininas. A produção das micotoxinas, no geral, está frequentemente associada às condições climáticas. Por exemplo na produção de ocratoxina, *Penicillium* a produz em regiões de climas temperados, já *Aspergillus* prefere climas mais quentes (SWEENEY; DOBSON, 1998).

Esses gêneros são, portanto, os principais contaminantes fúngicos e produtores de micotoxinas em rações, uma vez que são os mais comuns como comprovado em um estudo de análise de rações destinadas a pássaros, em que foram analisadas 60 amostras de ração comercializadas no Rio de Janeiro, *Aspergillus* foi encontrado em 82% das rações, enquanto que a frequência de *Cladosporium* foi de 50% e de *Penicillium* foi de 42%. Também foi determinada a contaminação de 95% das rações por fumonisinas e 40% por aflatoxinas (QUEIROZ et al, 2013).

Ainda sobre os gêneros identificados nas rações, em 2014, Alves et al analisaram 45 amostras de rações, das quais 15 eram destinadas aos suínos, 15 às aves e 15 aos cães, e identificou nas mesmas 8 espécies de *Aspergillus*. Destas, *A. flavus* possuiu a maior frequência (60,93%), embora nenhuma de suas cepas produzisse afltoxinas (ALVES et al, 2014).

Também em um trabalho realizado com ração para gatos, no qual as amostras foram classificadas como *Premium* e “rações de mercearias”, foi constatado uma maior presença de *Aspergillus* sp. nas amostras *Premium*. Os autores enfatizaram que este achado, na verdade, não foi surpreendente, pois espécies de *Aspergillus* são fungos do solo contaminantes comuns do milho, amendoim e outros cereais comumente utilizados na produção de alimentos para animais (SINGH; BAIJNATH; CHUTURGOON, 2017).

Outro fator importante é que as aflatoxinas também são frequentemente encontradas em países com o clima quente, e pesquisadores tem associado seu aparecimento na Europa com mudanças climáticas (KOCSUBÉ et al, 2013). Foi ressaltado também por Pereira, Carvalho e Prado (2002) que os principais fatores para deterioração dos alimentos são a atividade de água, temperatura, potencial de oxirredução e a concentração de oxigênio. Desta forma, por mais que as rações estivessem em suas embalagens originais, fatores como contaminação da matéria prima no campo e durante o processamento das rações por falta de medidas de controle, associados ao clima do Brasil, podem justificar a presença de *Aspergillus* e *Penicillium* nas amostras analisadas.

Quanto às amostras vendidas em embalagens previamente abertas, em particular das amostras C3 e G3, verificou-se um menor quantitativo de colônias fúngicas, tanto quando comparadas às amostras vendidas em embalagens originalmente fechadas como também entre as amostras comercializadas a granel (Tabelas 1 e 2). Para estas amostras (C3 e G3) a técnica de diluição seriada (Figura 10 - ANEXOS) mostrou que houve uma pequena quantidade de UFC/g em ambas as amostras, com crescimento de colônias fúngicas apenas na diluição 10^{-2} . As demais diluições não apresentaram colônias de fungos filamentosos, embora tenham apresentado algumas colônias de leveduras que não foram contabilizadas por não ser o objetivo do trabalho.

Quanto ao índice de contaminação, utilizando a técnica de plaqueamento direto (Figuras 11 - ANEXOS), a amostra C3 e G3 apresentaram os maiores índices, com 76 % e 72 %, respectivamente. Esses resultados corroboram com os encontrados por Hillmann et al (2015), que analisaram duas amostras de ração (uma para cão e uma para gato) e percebeu que a contagem média de fungos em rações de embalagens fechadas (1,89 UFC/g) foi maior que nas rações que estavam expostas ao ambiente (1,76 UFC/g).

Tabela 2. Quantificação e índice de contaminação por fungos em rações para cães e gatos comercializadas a granel (embalagens originais previamente abertas) no município de Serra Talhada, PE.

Amostra	Quantificação de fungos (UFC/g) por diluição				IC	Presença de <i>Aspergillus</i>	Presença de <i>Penicillium</i>
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}			
C3	0	33	0	0	76%	Sim	Sim
C4	0	0	0	$1,33 \times 10^4$	96%	Sim	Sim
G3	0	33	0	0	72%	Sim	Sim
G4	33	0	0	0	94%	Sim	Sim

IC = Índice de Contaminação; UFC = unidades formadoras de colônias; C3 e C4 = ração para cães; G3 e G4 = ração para gatos; os valores estão expressos pelas médias das triplicatas de cada diluição.

As amostras C4 e G4 (Figura 10 - ANEXOS) também apresentaram uma menor quantidade de Unidades Formadoras de Colônia quando comparadas com as amostras comercializadas em embalagens originais (Tabela 2), apesar de a amostra C4 tenha apresentado várias colônias de leveduras e de ter sido observado a presença de moscas na ração no momento da compra, além da presença de gatos no estabelecimento de venda, que poderiam ser veiculadores de microrganismos. Já o índice de contaminação, obtido pelo método do plaqueamento direto (Figura 11 - ANEXOS), foi alto sendo de 96% e 94% respectivamente.

Apesar das amostras em embalagens fechadas terem um número de colônia fúngicas superior as de embalagem aberta, a Análise de variância (ANOVA) não mostrou diferença significativa entre as mesmas. Porém, todas as amostras apresentaram *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em concordância com o trabalho de Barbosa et al (2014) que observou a presença desses gêneros ao analisar rações para gatos.

Acredita-se que o fato de haver uma maior quantidade de UFC nas rações comercializadas em suas embalagens originais, deve-se à possibilidade de ter havido contaminação no momento da produção da ração, seja pela forma ou equipamentos utilizados ou pelos ingredientes que poderiam ter

alguma contaminação fúngica, uma vez que parte dos fungos encontrados, pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp., são comumente encontrados em grãos de milho, que é um dos ingredientes da maioria das rações comercializadas.

Esse fato pode ser observado em um trabalho no qual foi analisada a presença de micotoxinas em grãos de milho que eram destinados à produção de ração para animais domésticos na região de Pirassununga, no estado de São Paulo, e embora houvesse ausência de fungos filamentosos, todas as amostras de milho foram positivas para Fumonisina além de apresentaram uma concentração total de Aflatoxinas inferior a 5 µg/Kg (CRUZ, 2010).

Outro estudo que comprova a influência dos grãos utilizados no processo de fabricação da ração foi realizado por Campos et al. (2008), no intuito de comparar a contaminação fúngica e por micotoxinas em amostras da matéria prima utilizada para fabricação de rações (fubá de milho, grãos de milho e sorgo) bem como da própria ração pronta para consumo e chegaram à conclusão que *Aspergillus* sp. estava presente em pelo menos 65 % das amostras e que em 100% das amostras da matéria prima foi detectada a contaminação por aflatoxinas. Este resultado salienta a interferência da contaminação dos grãos utilizados para a produção de rações, o que determina a perda de qualidade destes produtos independentemente de serem comercializados em suas embalagens originais ou a granel.

Há também a possibilidade de contaminação durante o processo de armazenamento das rações pois, em um estudo realizado em Santa Catarina 27 amostras de ração para cães obtidas de silos de armazenamento de produtores, foram analisadas e encontrados fungos em 26 das 27 amostras, pertencentes ao gênero *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, além da presença da micotoxina deoxinivalenol em 7,4% das amostras (OLDONI; ROSA; TEIXEIRA, 2012).

A contaminação das rações também pode ter ocorrido durante o processamento da ração, pois em uma das etapas de produção da ração, chamada de extrusão, ocorre a mistura dos ingredientes em altas temperaturas e pressões que podem modificar a qualidade do produto. O processo de secagem também é importante, pois é nessa etapa que será retirada a

umidade do produto e então a ração vai para o silo, onde ficará estocada até o momento de ser embalada para transporte (MENDES, 2003).

Além disso, é necessário que durante o processamento dê-se atenção aos grãos que possam estar danificados, rachados ou mal formados, pois estes são propícios ao crescimento fúngico, além de a maioria das micotoxinas serem encontrados nesses grãos fracionados e no pó formado pelo manuseio dos mesmos (DIAS, 2018). Assim, pode-se evitar a proliferação de fungos selecionando os grãos que irão compor a ração, bem como fazer a lavagem dos mesmos, visto que as micotoxinas produzidas, geralmente, ficam sobre a superfície do grão (LEUNG; DIAZ-LLAND; SMITH, 2006).

A indústria de alimentos tem um grande desafio com relação a análise prévia dos ingredientes que compõem a ração para a presença de micotoxinas, pois as mesmas não se distribuem igualmente entre os grãos. Dessa forma ao se fazer a análise, pode-se obter um resultado falso-positivo ou falso-negativo, aceitando um lote de grãos que tem níveis de micotoxinas maior que o aceitável, ou rejeitando um que estivesse adequado para o uso (LEUNG; DIAZ-LLAND; SMITH, 2006).

Assim, o melhor combate às micotoxinas é a prevenção, e para Stroka e Gonçalves (2019), estratégias como melhoramento genético e tradicional de plantas resistentes, monitoramento de condições climáticas favoráveis ao crescimento fúngico e aplicação em campo de fungos competitivos não-tóxicos podem funcionar.

Os autores ainda apontam que durante o processamento dos grãos e rações é possível diminuir o potencial tóxico das micotoxinas. As fumonisinas e aflatoxinas, por exemplo, podem ser parcialmente degradadas ao se tratar o grão de milho com cal ou cinza. As aflatoxinas também podem ser reduzidas com amônia, embora esse tratamento diminua o valor nutritivo das rações, outras estratégias também estão sendo pesquisadas (STROKA; GONÇALVES, 2019).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como o número de fungos filamentos foi maior nas rações comercializadas em embalagens fechadas, percebe-se que a forma de comercialização não é suficiente para determinar a qualidade da ração em relação à contaminação fúngica, já que em outros trabalhos citados as rações expostas ao ambiente apresentaram uma maior quantidade de colônias fúngicas em comparação com as que permaneceram fechadas, embora não tenha havido diferença estatística significativa entre as amostras.

Apesar de não ter havido diferença estatística significativa entre a quantidade de fungos filamentos encontrada em rações comercializadas em embalagens fechadas e a granel, ressalta-se a importância das embalagens na proteção da qualidade do alimento com relação às características químicas, tais como cor, sabor e nutrientes, bem como biológicas, quanto a prevenir proliferação bacteriana ou o contato com insetos que possam ser veiculadores de patógenos.

Percebe-se também a necessidade de haver uma legislação que estabeleça os limites seguros da quantidade de UFC/g de fungos a fim de se evitar a produção de micotoxinas, além de maior fiscalização quanto à qualidade dos ingredientes utilizados na fabricação das rações bem como condições adequadas de produção, armazenagem e comercialização desses alimentos.

Diversas doenças que acometem cães e gatos estão diretamente relacionadas à alimentação dos animais, como por exemplo, alergias alimentares, diabetes, doenças hepáticas e renais, obesidade e cardiopatias. Os índices de cânceres em animais domésticos têm aumentado consideravelmente, o que pode estar associado à maior longevidade destes animais, mas que não exclui uma possível relação com a ingestão de alimentos de baixa qualidade, incluindo aqui aqueles contaminados com micotoxinas, que a longo prazo têm efeitos cancerígenos e tóxicos, principalmente no fígado e nos rins. Neste contexto, existe uma necessidade de estudos mais aprofundados que tragam respostas mais esclarecedoras sobre a influência da qualidade das rações e a qualidade de vidas dos *pets*.

6. REFERÊNCIAS

- ADEYEYE, S. A. O. Fungal mycotoxins in food: a review. *Congent Food & Agriculture*, v. 2, p. 1- 11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2016.1213127>> Acesso em: 04/10/2018.
- ALVES, V. C. CARDOSO FILHO, F. C. PEREIRA, M. M. G. COSTA, A. P. R. MURATORI, M. C. S. Identificação de espécies de *Aspergillus* e potencial toxigênico de *Aspergillus flavus* isolados de rações comerciais. *Revista Científica de Produção Animal*, v.16, n. 12, p. 131-136, 2014.
- AQUINO, S. POTENZA, M. R. Análise da microbiota associada à entomofauna em rações a granel para animais domésticos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 80, n. 2, p. 243-247, 2013.
- ATANDA, S. A., PESSU P. O., AGODA, S., ISONG, I. U. ADEKALU, O. A., ECHENDU, M. A., FALADE, T. C. Fungi and mycotoxins in stored foods. *African Journal of Microbiology Research*. Lagos, Nigeria, v. 5, n. 25, p. 4373-4382, 2011.
- BARBOSA, I. P. RODRIGUES, A. M. D. MURATORI, M. C. S. FERREIRA, M. D. S. CARDOSO FILHO, F. C. PEREIRA, M. M. G. Espécies fúngicas isoladas de ração para gatos comercializadas. *PUBVET*, v. 8, n. 15, 2014.
- BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, DC, v.16, n. 3, p. 497-516, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164220/>> . Acesso em: 05/04/2017.
- BORGES, L. R., PIMENTEL, I. C., BEUX, M. R., TALAMINI, A. Contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) e isolamento de gêneros potencialmente micotoxigênicos. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 103-110, 2002.
- BOSSOLAN, N. R. S. Introdução à Microbiologia. Universidade de São Paulo. Licenciatura em Ciências Exatas. Disciplina Biologia 3, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2002.
- BUENO, D. J. SILVA, J. O. OLIVER, G. Mycoflora in commercial pet foods. *Journal of Food Protection*, v. 64, n. 5, p. 741-743, 2001.
- CAMPOS SG, CAVAGLIERI L. R., FERNANDEZ JURI, M. G., DALCERO A. M, KRUGER C., KELLER L. A. M., MAGNOLI C. E, ROSA C.A.R. Mycobiota and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92 (2008) 377–383.
- COPETTI, M. V. Avaliação micológica de rações comerciais para cães e gatos e potencial micotoxigênico de espécies selecionadas. 2005. 68f.

- Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CRUZ, J. V. S. Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo. 2010. 88f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP.
- DA ROCHA, M. E. B., FREIRE, F. C. O., GUEDES, M. I. F. Fungos isolados a partir de rações para roedores comercializadas na cidade de Fortaleza – Ceará. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 04, n. 01, p. 23 – 29. 2010.
- DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biology*, v. 38, p. 41-55, 2008.
- DIAS, A. S. Micotoxinas em produtos de origem animal. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, n. 30, 2018.
- DITCHFIELD, C. Estudo dos Métodos para a Medida da Atividade de Água. Universidade de São Paulo (Dissertação de Mestrado), 2000.
- FREIRE, F. C. O. VIEIRA, I. G. P. GUEDES, M. I. F. MENDES, F. N. P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. *Embrapa Agroindústria Tropical*, 48p, 2007.
- GARCIA, D. M. Análise de atividade de água em alimentos armazenados no interior de granjas de integração avícola. 2004. 50f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- GIRO, T. M. S. NADER FILHO, A. ROSSI JUNIOR, O. D. AMARAL, L. A. GIRO, R. J. S. Qualidade microbiológica de rações para cães comercializadas no varejo em embalagem fechada e a granel. *Revista ARS Veterinaria*, v. 28, n. 1, p. 36-40, 2012.
- GMP+ Feed Certification scheme. Specific Feed Safety Limits. 2017.
- GUTERRES, K. SILVA, C. GIORDANI, C. MATOS, C. ATHAYDE, C. DILKIN, P. GRECCO, F. CLEFF, M. Surto de aflatoxicose aguda em cães no município de Pelotas/RS. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, n. 11, p.1281-1286, 2017.
- HIBBETT, D.S., et al. (2007) A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111, 509-547.
- HILLMANN, B., SORIANO, V. S., PETROLI, T. G., MACCARI, M. Análise microbiológica de rações para cães comercializadas a granel e em embalagem fechada. *Enciclopédia Biosfera*. Centro Científico Conhecer, Goiânia, GO, v. 11, n. 21, p. 134-141, 2015.
- HOCKING, D.; PITT, J. I. Dichloran-Glycerol Medium for Enumeration of Xerophilic Fungo from Low-Moisture Foods. *Applie and Environmental Microbiology*, v. 39, n. 3, p. 488-492, 1980.
- HOMEI, A.; WORBOYS, M. Fungal Disease in Britain and the United States 1850-2000: Mycoses and Modernity. Basinstoke (UK): Palgrave Macmillan, 2013. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169216/>>
20/01/2019.

Acessado em:

- IAMANAKA, B. T., OLIVEIRA, I. S., TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, vol. 7, p.138-161, 2010.
- IBGE – População de Animais de Estimação no Brasil, 2013. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais/tematicas/documentos/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/anos-anteriores/ibge-populacao-de-animais-de-estimacao-no-brasil-2013-abinpet-79.pdf/view>> Acessado em 13 de dezembro de 2018.
- JOBIM, C. C., GONÇALVES, G. D., SANTOS, G. T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “versus” desempenho animal e qualidade de seus produtos. Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas. Maringá, p. 242-261, 2001.
- KOCSUBÉ, S.; VARGA, J.; SZIGETI, G.; BARANYI, N.; SURI, K.; TÓTH, B.; TOLDI, E. BARTÓK, T.; MESTERHÁZY, A. *Aspergillus* species as mycotoxins producers in agricultural products in Central Europe. Journal of Natural Sciences, n. 124, p. 13-25, 2013.
- LANGE, L. The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges. IMA Fungus, v. 5, n. 2, p. 463-471, 2014.
- LEITE, C. L.; ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultraestrutura. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.) Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2010, p. 15-44.
- LEUNG, M. C. K.; DÍAZ-LLAND, G.; SMITH, T. Mycotoxins in Pet Food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, p. 9623-9635, 2006.
- MACCHERONI JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. Ecologia: *habitat* e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.) Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2010, p. 451-490.
- MAIA, L. C.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Introdução: os fungos do Brasil. In: FORZZA, R. C. (Org.) Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, 2010. p. 43-48.
- MALLMANN, C. A., DILKIN, P., MALLMANN, A. O., TYSKA, D., DRIEMEIER, D. Efeitos das Micotoxinas em Pets. International Pet Meeting, São Paulo, 2009.
- MARTÍN, J. F.; CASQUEIRO, J.; LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. Current Opinion in Microbiology, v. 08, p. 282-293, 2005.
- MARTINS, M. L. MARTINS, H. M. BERNARDO, F. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v. 98, n. 548, p. 179-183, 2003.

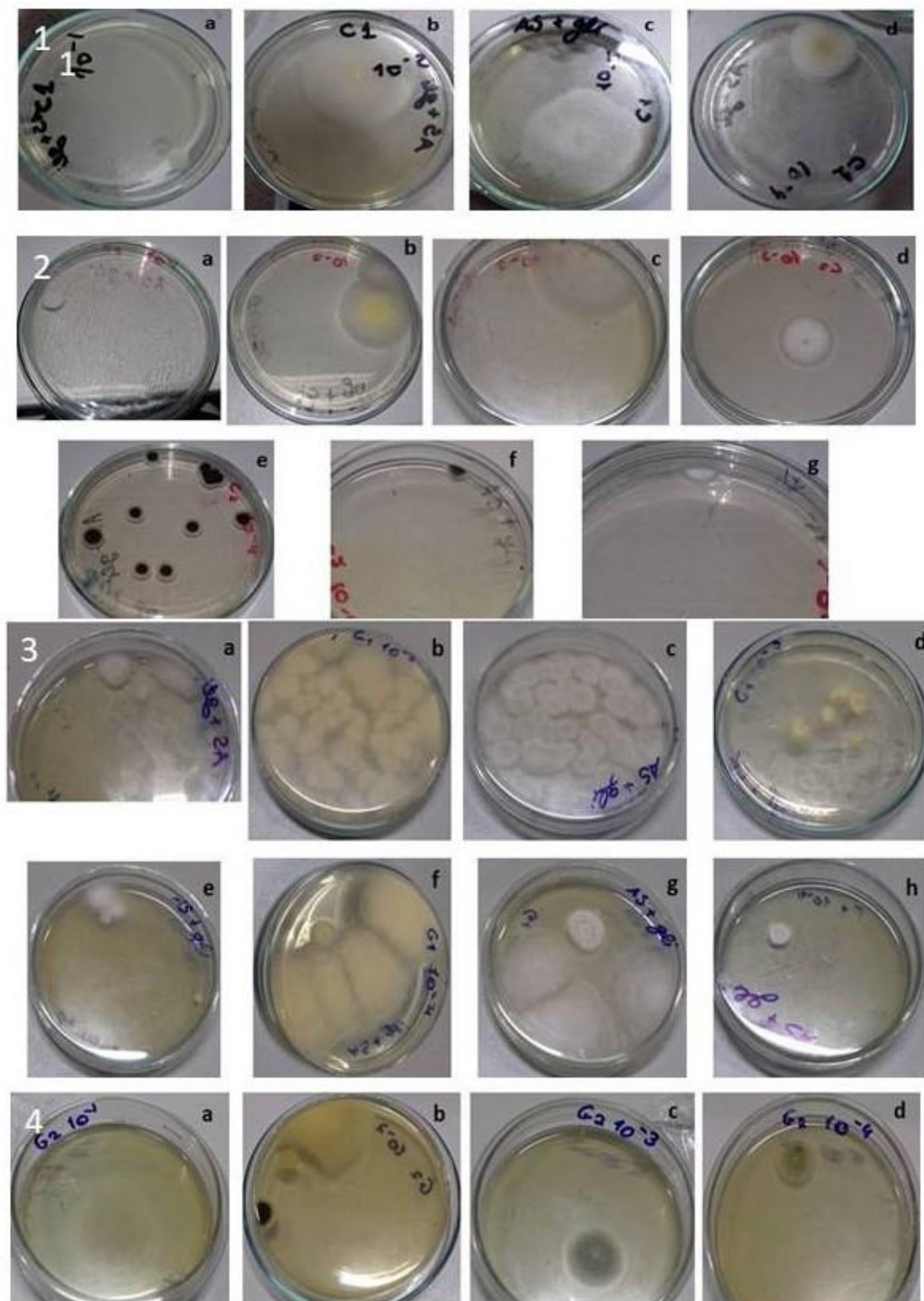
- MARSH, K. BUGUSU, B. Food Packaging – Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 03, 2007.
- MAZIEIRO, M.T.; BERSOT, L.S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. Campina Grande, v. 12, n.1, p. 88-99, 2010.
- MEDEIROS, F. H. V.; MARTINS, S. J.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S.; BATISTA, L. R.; MACHADO, J. C. Biological controlo of mycotoxin-producing molds. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 36, n. 5, p. 483-497, 2012.
- MENDES, A. C. Análise do processo de extrusão na indústria de *pet food* para a aplicação de técnicas de controle avançado. Dissertação de Mestrado, 98f. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- MENDES, J. V., PIRES, P. G. S., TEIXEIRA, L., MAIER, J. C., BERNARDI, E. Avaliação de alimentos secos industrializados para cães e gatos expostos ao ambiente. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, Goiânia, v. 10, n. 19, p. 306 – 318, 2014.
- MUZOLON, P. Micotoxicoses em cães. Dissertação de Mestrado, 94f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- NEWMAN, S. J. SMITH, J. R. STENSKE, K. A. NEWMAN, L. B. DUNLAP, J. R. IMERMAN, P. M. KIRK, C. A. Aflatoxicosis in nine dogs after exposure to contaminated commercial dog food. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 19, p. 169-175, 2007.
- OLDONI, M. L.; ROSA, A. D.; TEIXEIRA, M. L. Análises micotoxicológicas em rações comercializadas no oeste de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 14, n. 4, p. 373-379, 2012.
- PACHECO, A. M.; LUCAS, A.; PARENTE, R.; PACHECO, N. Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 2, p.330-334, 2010.
- PARDO, E.; MARÍN, S.; SOLSONA, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiology*, v. 21, p. 267–274, 2004.
- PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e Produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 20, n. 1, p. 141-156, 2002.
- PITT, J. I. et al. *Food mycology*. 3. ed. Washington, 1996.
- PITT, J. I.; HOCKING, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. Springer Dordrecht Heidelberg London, New York. Third Edition, 2009.
- PITT, J. I.; MILLER, J. D. A concise history or mycotoxin research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, p. 7021-7033, 2017.
- QUEIROZ, B. PEREYRA, C. M. KELLER, K. M. ALMEIDA, T. CAVAGLIERI, L. R. MAGNOLI, C. E. ROCHA ROSA, C. A. Fungal contamination and determination of fumonisins and aflatoxins in commercial feeds intended

- for ornamental birds in Rio de Janeiro, Brazil. Letters in Applied Microbiology, v. 57, p. 405-411, 2013.
- ROSA, C. A. R. PIMENTA, A. L. P. GATTI, M. J. RIBEIRO, J. M. ROCHA, C. G. PIRES, R. C. ALMEIDA, T. M. LUCENA, F. P. BACELAR, A. Aflatoxicose natural em cães no Estado do Rio de Janeiro. XXIX Conbravet, Gramado, RS, 2002.
- SANTURIO, J. Fungos e micotoxinas em rações pets. Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2007. Disponível em: <http://www.yes.ind.br/pdfs/Fungos_e_Micotoxinas_em_Racoes_Pets.pdf>. Acesso em: 06/04/2017.
- SILVA, L. F. Fungos: um estudo sobre a sua ocorrência nos alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.
- SILVA, P. M.; SOUZA, I. E. R.; RAMOS, M. H. C.; MOREIRA, W. M. Q.; CAMPOS, A. P. Fungos xerofílicos: métodos para isolamento e enumeração. Revista Fafibe On-line, Bebedouro, SP, v. 08, n° 01, p. 371-377, 2015.
- SINGH, S. D. CHUTURGOON, A. A. A comparative analysis of mycotoxin contamination of supermarket and premium brand pelleted dog food in Durban, South Africa. Journal of the South African Veterinary Association, v. 88, n. 0, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.4102/jsava.v88i0.1488>> Acesso em: 05/12/2018.
- SINGH, S.D., BAIJNATH, S. & CHUTURGOON, A.A., 2017, 'A comparison of mycotoxincontamination of premium and grocery brands of pelleted cat food in South Africa', Journal of the South African Veterinary Association 88(0), a1480. <https://doi.org/10.4102/jsava.v88i0.1480>
- SCHWEIZER, R. M. DURVASULA, A. SMITH, J. VOHR, S. H. STAHLER, D. R. GALAVERNI, M. THALMANN, O. SMITH, D. W. RANDI, E. OSTRANDER, E. A. GREEN, R. E. LOHMUELLER, K. E. NOVEMBRE, J. WAYNE, R. K. Natural Selection and origin of a melanistic allele in North American Gray Wolves. Molecular Biology and Evolution, v. 35, b. 5, 2018.
- STROKA, J.; GONÇALVES, C. Mycotoxins in food and feed: an overview. Encyclopedia of Food Chemistry, v. 1, p. 401- 419, 2019.
- SWEENEY, W.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. International urnal of Food Microbiology, v. 43, p. 141-158, 1998.
- VARGA, J.; BARANYI, N.; MUTHUSAMY, C.; VÁGVÖLGYI, C.; KOCSUBÉ, S. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update. Acta Biologica Szegediensis, v. 59, n. 2, p. 151-167, 2015.
- WOUTERS, A. T. B. CASAGRANDE, R. A. WOUTERS, F. WATANABE, T. T. N. BOABAID, F. M. CRUZ, C. E. F. DRIEMEIER, D. An outbreak of aflatoxin poisoning in dogs associated with aflatoxin B1 – contaminated maize products. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 25, n. 2, p. 282-287, 2013.

ZAKI, M. M.; EL-MIDANY, S. A.; SHAHEEN, H. M.; RIZZI, L. Mycotoxins in animals: occurrence, effects, prevention and management. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences, v. 04, n. 01, p. 13-28, 2012.

ANEXOS

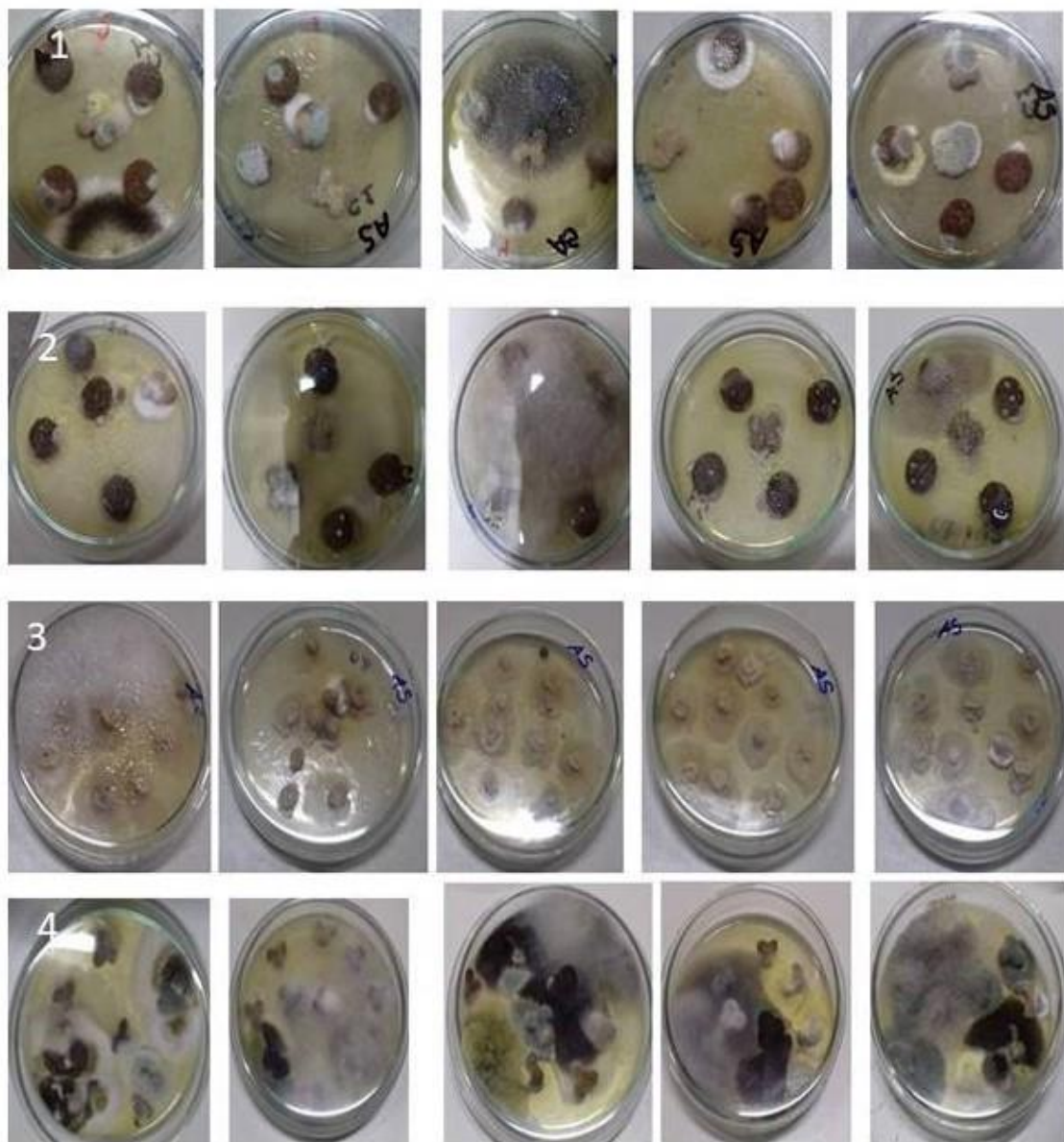
Figura 8. Unidades Formadoras de Colônias obtidas por meio da técnica de diluição seriada das amostras comercializadas em embalagens originais fechadas.



1. Amostra C1 diluições: a – 10^{-1} ; b, c – 10^{-2} ; d – 10^{-4} . 2. Amostra C2 diluições: a – 10^{-1} ; b, c – 10^{-2} ; d – 10^{-3} ; e, f, g – 10^{-4} . 3. Amostra G1 diluições: a – 10^{-1} ; b, c – 10^{-2} ; d – 10^{-3} ; e, f, g – 10^{-4} . 4. Amostra G2 diluições: a – 10^{-1} ; b, c – 10^{-2} ; d – 10^{-3} ; e, f, g – 10^{-4} .

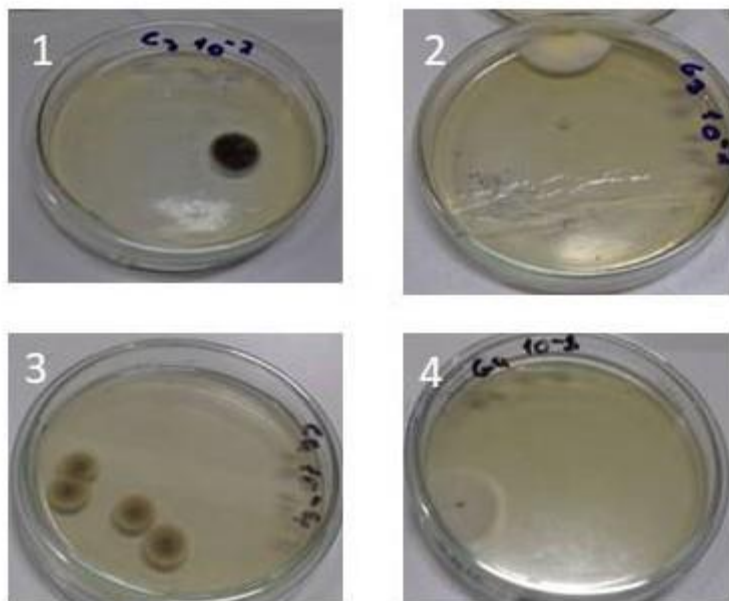
10^{-2} ; d, e – 10^{-3} ; f, g, h – 10^{-4} . 4. Amostra G2 diluições: a – 10^{-1} ; b – 10^{-2} ; c – 10^{-3} ; d – 10^{-4} .

Figura 9. Crescimento de fungos filamentosos a partir do plaqueamento direto de grãos de ração comercializadas em embalagens originais fechadas,



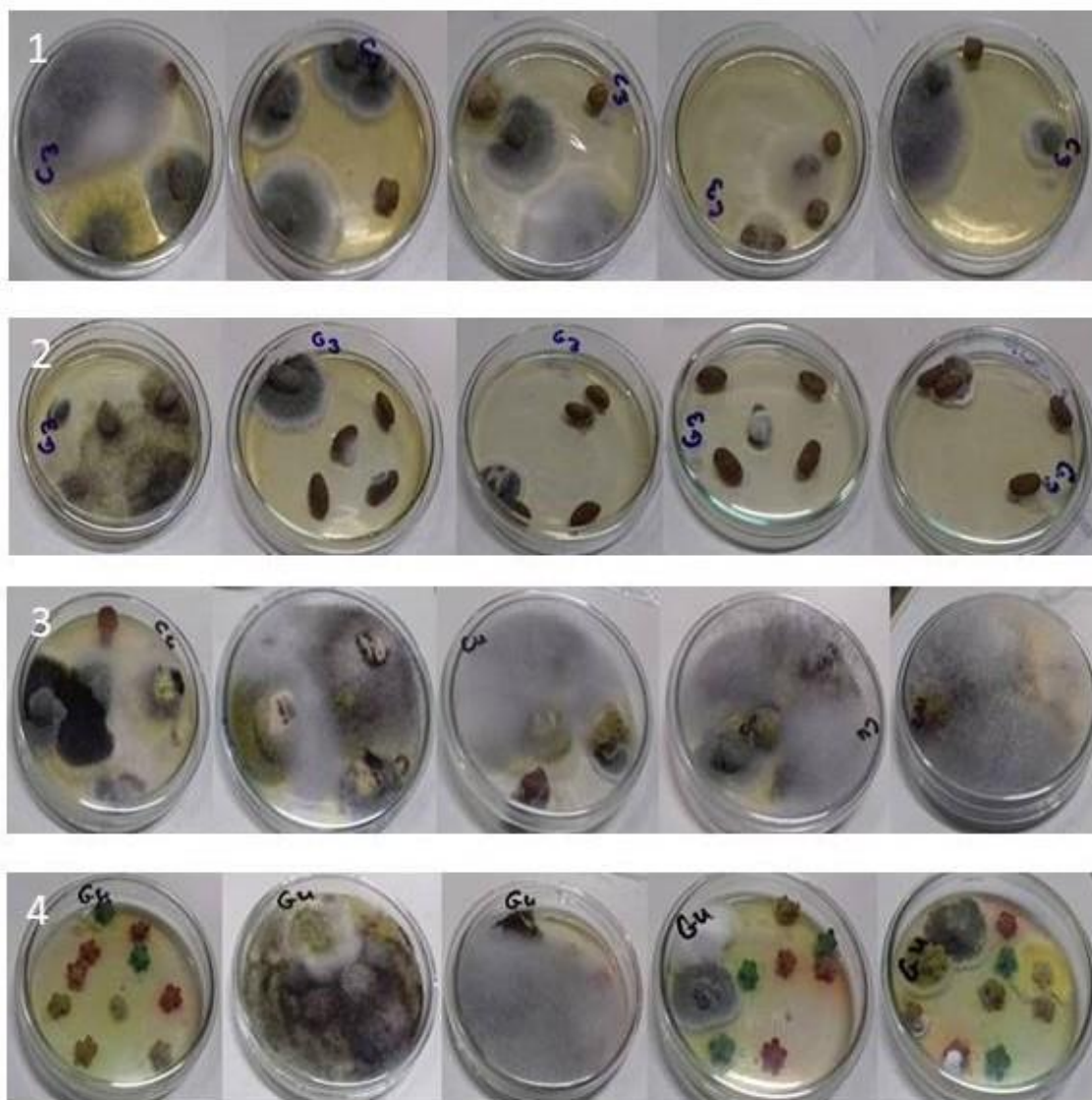
1. Amostra C1; 2. Amostra C2; 3. Amostra G1; 4. Amostra G2.

Figura 10. Unidades Formadoras de Colônias de fungos obtidas por meio da técnica de diluição seriada das amostras comercializadas a granel.



1. Amostra C3 – diluição 10^{-2} ; 2. Amostra G3 – diluição 10^{-2} ; 3. Amostra C4 – diluição 10^{-4} ; amostra G4 – diluição 10^{-1} .

Figura 11. Crescimento de fungos filamentosos a partir do plaqueamento direto de ração comercializada à granel.



1. Amostra C3; 2. Amostra G3; 3. Amostra C4; 4. Amostra G4.