



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA**

**PRODUÇÃO DE AFLATOXINA B₁ E OCRATOXINA A
EM RADÍCULA DE CEVADA UTILIZADA
NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL**

JÉSSIKA MARA MARTINS RIBEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Seropédica, RJ



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

**PRODUÇÃO DE AFLATOXINA B₁ E OCRATOXINA A
EM RADÍCULA DE CEVADA UTILIZADA
NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL**

JÉSSIKA MARA MARTINS RIBEIRO

Sob a Orientação do Professor
Carlos Alberto da Rocha Rosa, *Ph.D.*, LD-

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção
do grau de **Magister Scientiae**
em Microbiologia Veterinária

**Seropédica, Rio de Janeiro
Fevereiro de 2004**

636.0895952493 Ribeiro, Jéssika Mara Martins, 1977-
R484p Produção de aflatoxina B₁ e ocratoxina A
T em radícula de cevada utilizada na
 alimentação animal / Jéssika Mara Martins
 Ribeiro . 2004 .
 42f. il. ,graf., tab.

 Orientador: Carlos Alberto da Rocha Rosa.
 Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto
de Veterinária .
 Bibliografia: f. 34-40.

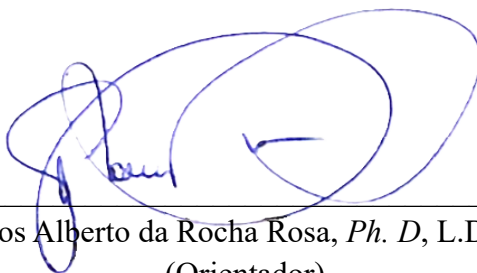
 1. Micotoxinas - Teses. 2. Cevada - Teses.
3. Aflatoxina - Teses. 4. Ocratoxinas Teses.
I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha, 1953- .
II. Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Instituto de Veterinária. III.
Título.

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

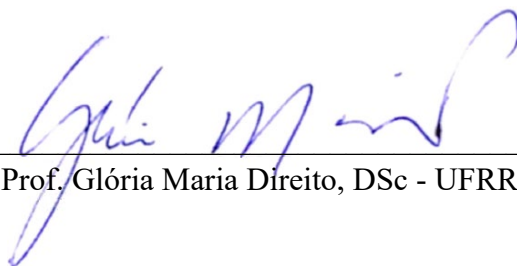
JÉSSIKA MARA MARTINS RIBEIRO

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de *Magister Scientiae*, em Microbiologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/02/2004.



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



Prof. Glória Maria Direito, DSc - UFRRJ



Prof. Olney Vieira da Motta, DSc - UENF

*Dedico este trabalho a
minha mãe, pelo amor e
dedicação constantes. Grande
amiga e incentivadora...*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Carlos Alberto da Rocha Rosa pela orientação e, fundamentalmente pelo apoio e amizade essenciais para a concretização deste trabalho.

A professora Glória Maria Direito pelos ensinamentos em cromatografia líquida e auxílio nos momentos críticos.

A professora Miliane Moreira pela orientação no estágio à docência, oportunidade de participar de aulas intensas e dinâmicas.

Ao pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz Mário Gatti pelo fornecimento das cepas fúngicas de referência utilizadas neste experimento.

Ao professor Augusto Vital pelas análises de nutrição realizadas no laboratório sob sua supervisão.

Ao meu noivo Adriano, grande companheiro, cujo apoio foi fundamental para concluir este trabalho. As minhas irmãs Andréa e Priscila, sempre na torcida por novas conquistas.

À Carla Souza, mestranda em Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, pelas análises de atividade de água. E a todos os amigos, em especial a Vanessa pelos ensinamentos criativos e o companheirismo nesta jornada.

Aos estagiários Luiz, Kelly e Beatriz pela alegria da convivência e trabalho em grupo.

Aos funcionários do Projeto Sanidade Animal: Luís Jorge, Valcir Pires, Adevaldo e Jose pelo incentivo e suporte técnico.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

BIOGRAFIA

Jéssika Mara Martins Ribeiro, filha de Péricles Ferreira Martins Ribeiro e Raquel Carvalho Martins Ribeiro, nasceu no dia 29 de agosto de 1977, no bairro de Boa Vista, em Recife, Pernambuco.

Ingressou no Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) no primeiro período letivo de 1995. Estagiou no Hospital de Pequenos Animais desta Universidade e nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas. Neste último, foi bolsista de Iniciação Científica pelo programa PIBIC/CNPq no período de agosto de 1997 a janeiro de 2000, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa. Colou grau em abril de 2000, mesmo ano em que concluiu o Curso de Especialização em Controle de Qualidade de Alimentos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Trabalhou em clínica de pequenos animais entre 2000 e 2002. No período de 2001 a 2002 fez o curso de especialização em homeopatia para médicos veterinários, oferecido pelo Instituto Hahnemanniano do Brasil. Em março de 2002, iniciou o Mestrado em Microbiologia Veterinária da UFRRJ.

RESUMO

RIBEIRO, Jéssika Mara Martins Ribeiro **Produção de aflatoxina B₁ e ocratoxina A em radícula de cevada utilizada na alimentação animal**. Seropédica: UFRRJ, 2004. 42p. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia Veterinária).

Radícula de cevada foi testada como substrato para o crescimento de espécies fúngicas toxígenas pertencentes ao gênero *Aspergillus* (*A. flavus* NRRL 5520, *A. ochraceus* NRRL 3174, *A. niger* ATCC 1004, *A. carbonarius* UFPE 1546). Amostras de radícula com diferentes atividades de água (Aa) tais como 0,82, 0,91 e 0,95 foram inoculadas com cada cepa fúngica e incubadas por 21 dias em estufas BOD a 25°C e 30°C. *A. niger* não produziu ocratoxina A (OTA) na radícula em nenhum dos períodos de incubação avaliados (7, 14 e 21 dias), apesar de tê-la produzido em ágar coco. *A. flavus* produziu aflatoxina B₁ na radícula, detectada a partir dos sete dias de incubação. As maiores concentrações da toxina foram obtidas quando incubado a 25°C, temperatura na qual a Aa 0,95 permitiu melhor produção, enquanto a 30°C sobressaiu a Aa 0,82. *A. ochraceus* produziu mais OTA na radícula com Aa inicial 0,82, tanto a 25°C quanto a 30°C. A OTA foi produzida em concentrações próximas a 30.000 ng g⁻¹ de radícula. Aflatoxina B₁ e Ocratoxina A foram detectadas por CLAE usando detecção por ultravioleta e fluorescência, respectivamente.

ABSTRACT

RIBEIRO, Jéssika Mara Martins Ribeiro. **Aflatoxin B₁ and ochratoxin A production in barley rootlet used as alternative feed**. Seropédica: UFRRJ, 2004. 42p. (Dissertation, Magister Scientiae in Veterinary Microbiology).

Barley rootlet was tested as substrate for growing of mycotoxigenic species of fungi from genus *Aspergillus* (*A. flavus* NRRL 5520, *A. ochraceus* NRRL 3174, *A. niger* ATCC 1004, *A. carbonarius* UFPE 1546). Samples of rootlet with different water activities (a_w) as 0.82, 0.91 and 0.95 were inoculated with each fungi strains and incubated by 21 days in BOD at 25°C and 30°C. *A. niger* did not produce ochratoxin A (OTA) in the rootlet in none of the periods of evaluated incubation (7, 14 and 21 days), despite have produced it in Coconut Agar Medium. *A. flavus* produced aflatoxin B₁ in the rootlet, detected from the seven incubation days. The biggest concentrations of the toxin were obtained when incubated to 25°C, temperature in which the a_w 0.95 allowed the biggest production, while to 30°C excelled the a_w 0.82. *A. ochraceus* produced more OTA in the rootlet when used initial a_w 0.82, so to 25°C as 30°C. OTA was produced in near concentrations to 30.000 ng g⁻¹ of rootlet. Aflatoxin B₁ and Ochratoxin A were detected by HPLC using Ultraviolet and Fluorescence detection, respectively.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Radícula de cevada	03
2.2 Micobiota da cevada	03
2.3 O gênero <i>Aspergillus</i> Fr.: Fr.	05
2.4 Micotoxinas	06
2.4.1 Ocratoxina A	07
2.4.2 Aflatoxinas	09
2.4.3 Produção de micotoxinas	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Local	14
3.2 Amostras	14
3.3 Espécies fúngicas de referência	14
3.4 Composição nutricional da radícula de cevada	14
3.5 Avaliação do Perfil Nutricional das Cepas de Referência pela Utilização de Compostos Carbonados	15
3.5.1 Hidrólise do amido	15
3.5.2 Hidrólise da celulose	15
3.6 Verificação da Capacidade Toxígena das Cepas de Referência	15
3.6.1 Produção de aflatoxinas e ocratoxina A	15
3.6.2 Extração das micotoxinas	16
3.6.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)	16
3.7 Produção Experimental de Aflatoxinas e Ocratoxina A na Radícula de Cevada	17
3.7.1 Preparo do inóculo	17
3.7.2 Substrato	17
3.7.3 Inoculação e incubação	17
3.7.4 Extração de micotoxinas na radícula	18
3.7.5 Detecção da aflatoxina B ₁	18
3.7.6 Detecção da ocratoxina A	19
3.7.7 Fator de recuperação	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÕES	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
7. APÊNDICE	41

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Fungos filamentosos isolados a partir de grãos de cevada estocados, de acordo com HILL & LACEY (1983).....	04
Tabela 2. Toxidez aguda de ocratoxina A, segundo KROGH (1992).....	08
Tabela 3. Toxidez aguda de aflatoxina B ₁ expressa por uma dose oral simples, de acordo com MOSS (2002).....	11
Tabela 4. Resultado da análise percentual da composição nutricional das amostras de cevada, malte e radícula.....	21
Tabela 5. Utilização de compostos carbonados pelas cepas fúngicas de referência do gênero <i>Aspergillus</i> testadas.....	23
Tabela 6. Teste de fluorescência em meio agar coco e confirmação da produção de toxina pelas cepas de referência por cromatografia em camada delgada (CCD).....	24
Tabela 7. Produção média de AFB ₁ e OTA sobre radícula com diferentes atividades de água, inoculada com espécies de <i>Aspergillus</i> e incubada a 25 e 30°C, após três períodos de incubação (7, 14 e 21 dias).....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura da Ocratoxina A (OTA)	07
Figura 2. Estrutura química das principais aflatoxinas	10
Figura 3. Verificação da utilização da celulose, em meio Omelianski acrescido de tira de papel de filtro: (A) tubo com crescimento positivo (o da esquerda) e tubo negativo (o da direita); (B) <i>Aspergillus ochraceus</i> (NRRL 3174) positivo; (C) <i>A. niger</i> (ATCC 1004) positivo	22
Figura 4. Cromatogramas: (A) padrão de AFB ₁ com 10,4 µg mL ⁻¹ ; (B) amostra de radícula de cevada com Aa 0,95 inoculada com <i>Aspergillus flavus</i> (NRRL 5520) e incubada a 25°C por sete dias. Detector Merck-Hitachi UV-VIS L4250 ajustado para comprimento de onda de 350 nm. Coluna: Sílica de 150 x 4,6 mm i.d. Fase móvel composta por acetato de etila: n-hexano (3:2,5 - v/v), com fluxo de 1,5 mL/min.	26
Figura 5. Cromatogramas: (A) padrão de OTA com 51,36 µg mL ⁻¹ ; (B) amostra de radícula de cevada com Aa 0,91 inoculada com <i>Aspergillus ochraceus</i> (NRRL 3174) e incubada a 30°C por 14 dias. Detector de fluorescência Waters (modelo 420) e de absorvância Lambda-Max Waters (modelo 481) equipado com filtro de excitação de 330 nm e de emissão de 460 nm. Coluna: Octadecilssilano Microsorb MV C 18 de 250 x 4,6 mm i.d. Fase móvel: metanol: 9% ácido acético em água Milli-Q, pH 2,3 (72: 28 v/v) com um fluxo de 0,5 mL/min.	27
Figura 6. Produção de AFB ₁ por <i>Aspergillus flavus</i> (NRRL 5520), sob diferentes condições de Aa: (A) quando incubado a 25°C; (B) incubado a 30°C	29
Figura 7. Produção de OTA por <i>Aspergillus ochraceus</i> (NRRI 3174), sob diferentes condições de Aa: (A) incubado a 25°C; (B) incubado a 30°C....	31

RESUMO

RIBEIRO, Jéssika Mara Martins Ribeiro **Produção de aflatoxina B₁ e ocratoxina A em radícula de cevada utilizada na alimentação animal**. Seropédica: UFRRJ, 2004. 42p. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia Veterinária).

A radícula de cevada é utilizada na composição de rações animais pelo seu alto conteúdo protéico. Entretanto, dados micológicos e toxicológicos são escassos na literatura. Objetivou-se avaliar se a radícula é substrato adequado ao crescimento de fungos toxígenos e à conseqüente produção de micotoxinas, sob diferentes condições de atividade aquosa (Aa) e temperatura. Foi feita pesquisa de micotoxinas em 30 amostras de radícula, recebidas com baixa Aa (ao redor de 0,53), mensalmente no período de julho de 2001 a dezembro de 2003. Destas, apenas uma apresentou concentração traço de ocratoxina A (OTA). Para a produção de micotoxinas foram utilizadas espécies fúngicas de referência pertencentes ao gênero *Aspergillus*, testadas previamente quanto a sua capacidade celulolítica e amilolítica e verificado seu perfil toxígeno em Agar coco (CAM). O *Aspergillus carbonarius* (UFPE 1546) positivo para amilase e celulase mostrou-se atoxígeno em CAM e, foi excluído da avaliação da radícula como substrato para a produção de micotoxinas. O *A. niger* (ATCC 1004) positivo para celulase e amilase negativo, não produziu OTA na radícula em nenhum dos períodos de incubação avaliados (7, 14 e 21 dias), apesar de a ter produzido em CAM. O *A. flavus* (NRRL 5520) amilase e celulase positivo produziu aflatoxina B₁ (AFB₁) na radícula, detectada a partir dos sete dias de incubação. As maiores concentrações da toxina foram obtidas quando incubado a 25 °C, temperatura na qual a Aa 0,95 permitiu a maior produção, enquanto que a 30°C sobressaiu a Aa 0,82. O *A. ochraceus* (NRRL 3174) positivo para amilase e celulase produziu mais OTA na radícula quando utilizada Aa inicial 0,82, tanto a 25°C quanto a 30°C. A OTA chegou a ser produzida em concentrações próximas a 30.000 ng g⁻¹ de radícula. O método de extração e detecção de micotoxinas utilizado apresentou recuperação média de 86% e 82% para amostra de radícula com 150 ng g⁻¹ de AFB₁ e 150 ng g⁻¹ de OTA respectivamente.

Palavras chave: micotoxinas, síntese, avaliação de substrato.

ABSTRACT

RIBEIRO, Jéssika Mara Martins Ribeiro. **Aflatoxin B₁ and ochratoxin A production in barley rootlet used as alternative feed**. Seropédica: UFRRJ, 2004. 42p. (Dissertation, Magister Scientiae in Veterinary Microbiology).

Barley rootlet is used as feed by its high protean content. However, mycologies dates and toxicological are scarce in literature. The object of the work was to evaluate if the rootlet is adequate substratum to the mould mycotoxigenics growth and to consequent mycotoxins production, under different water activities (a_w) and temperature. The mycotoxins research was made in 30 rootlet samples, received with low a_w (around of 0.53), mensalmente in the July period 2001 to December 2003. Of them, just one presented ochratoxin A (OTA) trace concentration. For mycotoxins production were used species of fungi from genus *Aspergillus*, tested previously regarding your capacity of use cellulose and starch and verified its toxigenic profile in Coconut Agar Medium (CAM). *Aspergillus carbonarius* (UFPE 1546) positive for amilase and celulase, was nontoxigenic in CAM and, it was excluded from the evaluation of the rootlet as substratum for mycotoxins production. *A. niger* (ATCC 1004) positive for celulase and amilase negative, did not produce OTA in the rootlet in none of the periods of evaluated incubation (7, 14 and 21 days), despite have produced it in CAM. *A. flavus* (NRRL 5520) amilase and celulase positive produced aflatoxina B₁ (AFB₁) in the rootlet, detected from the seven incubation days. The biggest concentrations of the toxin were obtained when incubated to 25°C, temperature in which the a_w 0.95 allowed the biggest production, while to 30°C excelled the a_w 0.82. *A. ochraceus* (NRRL 3174) positive for amilase and celulase produced more OTA in the rootlet when used initial a_w 0.82, so to 25°C as 30°C. OTA was produced in near concentrations to 30.000 ng g⁻¹ of rootlet. Mycotoxins extraction and detection method used presented average recovery of 86% and 82% to rootlet sample with 150 ng g⁻¹ of AFB₁ and 150 ng g⁻¹ of OTA respectively.

Key words: mycotoxins, synthesis, substrate avaluation.

1 - INTRODUÇÃO

A contaminação de cereais por fungos é um problema de ordem mundial, pois está relacionada com a perda de qualidade dos alimentos, bem como a danos à saúde humana e animal, em função da produção de micotoxinas por estes microrganismos.

As micotoxinas compreendem um grupo de substâncias tóxicas, quimicamente complexas, oriundas do metabolismo secundário fúngico. Podem ser encontradas em uma grande variedade de produtos vegetais, desde que tenham existido, em algum momento da produção do alimento, condições propícias ao desenvolvimento fúngico e à produção destes metabólitos tóxicos. As micotoxinas e seus derivados também podem ser detectados em produtos de origem animal, tais como: carne, leite e ovos, em virtude do metabolismo das micotoxinas após sua ingestão pelos animais, através de grãos e rações contaminados.

Diversas espécies de fungos são atualmente conhecidas como capazes de produzir uma ou mais toxinas, em função do substrato, da cepa fúngica envolvida, da temperatura, umidade relativa e atividade aquosa, dentre outros fatores. Dentre as espécies toxígenas isoladas a partir de cereais em nosso País destacam-se as pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Este gênero compreende espécies produtoras de aflatoxinas, tais como o *A. flavus* e o *A. parasiticus* e, de ocratoxina A (OTA), tendo como principal produtor o *A. ochraceus*. Recentemente o *A. niger* e o *A. carbonarius* ganharam importância por serem considerados também ocratoxígenos, em regiões tropicais e subtropicais.

As aflatoxinas são amplamente encontradas em produtos agrícolas. Seus efeitos sobre a saúde de animais e do homem variam de acordo com a concentração em que estão presentes no alimento e na ração e, conseqüentemente, com a quantidade ingerida. Assim, podem ocorrer casos agudos decorrentes da ingestão de altas concentrações, ou o que é mais comum, quadros crônicos em virtude do consumo de baixos níveis por períodos prolongados. A sintomatologia aguda é mais evidente e correlacionada com a intoxicação, enquanto os casos crônicos são geralmente associados a outras causas e, mormente a outras patologias. Estes por serem mais freqüentes determinam grandes perdas econômicas, geralmente devido à interferência na resposta imunológica,

tornando os animais mais susceptíveis a doenças infecciosas e parasitárias, refletindo intensamente na produção animal.

A OTA é uma nefrotoxina com impacto principalmente na produção suína e aviária. É relativamente estável, sendo encontrada como resíduo nos tecidos animais, com exceção de bovinos. Nestes, acredita-se que ela seja eliminada em função da atuação de enzimas bacterianas e de protozoários, presentes no rumem. Esta micotoxina é a responsável pela Nefropatia Micotóxica Suína e Aviária e tem sido correlacionada com a Nefropatia Endêmica Balcânica, a qual acomete populações de áreas rurais da região dos Balcãs (Bulgária, Iugoslávia e Romênia).

Na produção animal, quanto maior a utilização de alimentos concentrados, à base de grãos, maior será a probabilidade de intoxicação por micotoxinas. A atividade agropecuária visando otimizar recursos e aumentar a competitividade de seus produtos tem buscado fontes alternativas de alimento. Dentre elas, a radícula que é um subproduto da industrialização da cevada, vem sendo utilizada na alimentação de bovinos e suínos.

A cevada passa por um processo denominado de malteação, onde os grãos são submetidos a uma etapa de maceração e germinação. Após a qual, tem-se o malte verde que é seco sob fluxo forçado de ar quente. Posteriormente é feita a clivagem, quando então se separa o malte, obtendo-se a radícula como subproduto. O malte é matéria-prima fundamental para a indústria cervejeira. Como a cerveja é uma das bebidas mais amplamente consumidas, o volume de produção de malte precisa ser grande o suficiente para atender a demanda. Conseqüentemente, grande quantidade de radícula também é produzida. Assim, destiná-la à produção animal tem sido uma alternativa interessante tanto para as malterias quanto para os pecuaristas, em função dos elevados níveis de proteína e fibra que apresenta e pelo baixo custo.

Dados sobre os aspectos micológicos e toxicológicos da radícula de cevada são escassos na literatura. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar se a radícula é substrato adequado ao crescimento de fungos toxígenos e à conseqüente produção de micotoxinas, sob diferentes condições de atividade aquosa (Aa) e temperatura.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Radícula de Cevada

A produção brasileira de cevada vem sendo realizada em escala comercial desde 1930, sempre feita em resposta à demanda da indústria de malte cervejeiro. Entre os anos de 1976 e 1982, com o Plano Nacional de Auto-suficiência em Cevada e Malte (PLANACEM) lançado pelo Governo Federal, ocorreu uma ampliação significativa da capacidade interna de malteação e armazenagem, além de uma intensificação e diversificação de pesquisa (MINELLA, 1999). Entretanto, apesar de possuir área, cultivares, tecnologia e consumo para cevada, o Brasil ainda importa aproximadamente 80 % do consumo interno (FAGUNDES, 2003). Isto ocorre em função da instabilidade das safras nacionais em quantidade e qualidade, o alto custo de produção e a falta de mercado alternativo para a produção fora do padrão indústria, que geralmente é usado para a produção animal vendido a preço baixo (MINELLA, 1999).

Para a produção do malte a cevada é submetida ao processo de malteação. Inicialmente, adiciona-se água aos grãos de cevada até que a umidade atinja aproximadamente 45% (LOPEZ-DIAZ & FLANNIGAN, 1997), permitindo germinação e promovendo conversões bioquímicas (VAN CAMPENHOUT et al., 1999). Posteriormente, os grãos são secos e mecanicamente separados das raízes emitidas durante a etapa de germinação e ainda, do excesso de cascas. Este subproduto denominado de radícula de cevada é então, utilizado em rações animais (LOPEZ-DIAZ & FLANNIGAN, 1997).

2.2 Micobiota da Cevada

Pesquisas sobre a microbiota da cevada têm focado principalmente os fungos filamentosos, por apresentarem maior influência nos aspectos relacionados com a qualidade do grão (NOOTS et al., 1998). A contaminação fúngica pode ocasionar redução na capacidade de germinação, redução no valor nutricional, podendo alterar a coloração e odor, prejudicando a qualidade do malte (ANDERSEN et al., 1996).

Antes da colheita, ainda no campo, os grãos de cevada estão sujeitos a uma determinada micobiota, composta principalmente por fungos dos gêneros *Fusarium*

spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Epicoccum* spp., *Aureobasidium* spp. e *Helminthosporium* spp. Esta micobiota pode variar de acordo com as condições geográficas e climáticas (NOOTS et al., 1998), representando a micobiota do ambiente onde o produto vegetal fora produzido ou armazenado.

Análises realizadas em grãos de cevada armazenados evidenciaram a presença de espécies fúngicas pertencentes a vários gêneros. Dentre estes foram relatadas a presença de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. por CLARKE & HILL (1981) e RABIE et al. (1997) que, juntamente com espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* spp., correspondem aos principais gêneros implicados na produção de micotoxinas, segundo PITT & HOCKING (1997). A tabela 1 apresenta algumas das espécies isoladas a partir de grãos de cevada.

Tabela 1. Fungos filamentosos isolados a partir de grãos de cevada estocados, de acordo com HILL & LACEY (1983).

Fungo	Frequência*	Fungo	Frequência*
<i>Absidia corymbifera</i>	2	<i>Geotrichum candidum</i>	1
<i>Acremonium</i> spp.	1	<i>Gliocadium roseum</i>	1
<i>Alternaria alternata</i>	1	<i>Mucor</i> spp.	1
<i>Aspergillus candidus</i>	2	<i>Paecilomyces varioti</i>	1
<i>A. flavus</i>	1	<i>Penicillium brevi-compactum</i>	1
<i>A. fumigatus</i>	3	<i>P. canescens</i>	1
<i>A. glaucus</i>	3	<i>P. chrysogenum</i>	1
<i>A. nidulans</i>	2	<i>P. citrinum</i>	1
<i>A. niger</i>	1	<i>P. funiculosum</i>	1
<i>A. ochraceus</i>	1	<i>P. verrucosum</i>	1
<i>A. restrictus</i>	1	<i>Penicillium</i> spp.	2
<i>A. terreus</i>	1	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	2
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	<i>Talaromyces emersonii</i>	1
<i>Cladosporium herbarum</i>	3	<i>Verticillium</i> spp.	1
<i>Epicoccum purpurascens</i>	1	<i>Wallemia sebi</i>	1
<i>Fusarium</i> spp.	1	<i>Leveduras</i>	3

* Frequência de isolamento: 1- isolado <10% das amostras; 2- 10-30% das amostras; 3- entre 30-50% das amostras.

Dados sobre a micobiota da radícula de cevada são raros na literatura. No entanto, ROSA (2002) ao analisar 37 amostras de radícula encontrou uma prevalência do gênero *Penicillium*, seguido por *Fusarium* e *Aspergillus*.

2.3 O Gênero *Aspergillus* Fr.: Fr.

Aspergillus é um gênero anamorfo, caracterizado pela produção de conídeos sobre uma estrutura especializada característica, denominada vesícula (KLICH & PITT, 1988). Este gênero é de particular importância por conter muitas espécies capazes de crescer em condições de baixa atividade de água (Aa), sendo então associadas com a deterioração de alimentos que são muito secos para serem atacados por outros microrganismos (SMITH & MOSS, 1985).

Apesar da maioria ser saprófita e comumente encontrada no solo, em vegetais em decomposição, sementes e grãos, algumas espécies são patogênicas como o *A. fumigatus*, agente de aspergilose pulmonar em humanos e aves. Outras são responsáveis pela produção de metabólitos secundários tóxicos (PITT, 1994). Dentre os principais gêneros toxígenos, o *Aspergillus* possui espécies de ocorrência mais freqüente e comum nos trópicos (PITT & HOCKING, 1997; SAMSON, 2000).

O *A. flavus* Link de acordo com KLICH & PITT (1988), pertence ao subgênero Circundatti, seção Flavi. É de distribuição mundial, predominando em áreas tropicais e subtropicais, sendo aparentemente mais comum em solos cultivados do que em não cultivados. Esta espécie é capaz de colonizar vegetais em decomposição, grãos, sementes e muitos outros substratos incluindo alimentos e rações animais (PITT & HOCKING, 1997; ROSA, 2002). Tem sido descrito ainda como patógeno para insetos e animais e, cerca de 50% dos isolados mostram-se aflatoxígenos (DOMSCH et al., 1980; CHRISTENSEN, 1981; PITT & HOCKING, 1997).

O *A. flavus* apresentou variações no crescimento quando houve alteração nas temperaturas de incubação, isto é, crescimento mínimo ao redor de 10-12°C, máximo entre 43-48°C e com um crescimento ótimo perto de 33°C (DOMSCH et al., 1980). As variações de atividade aquosa (Aa) que permitem o crescimento de *A. flavus* têm sido avaliadas desde baixas como 0,78 a 33°C (AYERST, 1969) a elevadas como 0,84 a 25°C (PITT & HOCKING, 1997). PITT & MICAMBLE (1995) estabeleceram Aa

mínimas em função da temperatura para o crescimento de *A. flavus* da ordem de 0,82 a 25°C, 0,81 a 30°C e de 0,80 a 37°C.

O *A. niger* Tieghem var. *niger*, pertence ao subgênero *Circundatti*, seção *Nigri* e é considerada uma espécie ubíqua, comumente isolada do solo, plantas, sementes, frutas secas e nozes (DOMSCH et al., 1980; PITT & HOCKING, 1985). É um dos fungos mais freqüentemente isolados a partir de alimentos e rações animais (ROSA, 2002).

A temperatura mínima de crescimento varia de 6-8°C, a máxima de 45-47°C com um ótimo a 35-37°C. É considerado um fungo xerofílico (AYERST, 1969), sendo descrita a germinação em Aa de 0,77 a 35°C (PITT & HOCKING, 1997). ABARCA et al. (2001) relatam a ocorrência de cepas ocratoxígenas numa incidência que varia de 1,7 a 18,5% dos isolados de *A. niger*.

A. ochraceus Wilhelm, pertence ao subgênero *Circundatti*, seção *Circundatti* e é freqüentemente isolado de solos cultivados, de vegetais e de sua rizosfera, de grãos armazenados e de uma ampla variedade de alimentos e rações animais (DOMSCH et al., 1980; PITT & HOCKING, 1985; ROSA, 2002)

Seu crescimento ocorre entre 8 e 37°C, com um ótimo a 24-31°C. A atividade de água mínima para crescimento é de 0,77 a 25°C, com um ótimo a 0,95-0,99 (PITT & HOCKING, 1997).

2.4 Micotoxinas

A FAO (Food & Agriculture Organization of United Nation) e a WHO (World Health Organization) patrocinam o JECFA (Joint Expert Committees on Food Additives) para verificar os riscos de várias micotoxinas para a saúde, de forma a estabelecer os limites máximos tolerados em alimentos (WHITAKER, 2003). Para o controle da exposição são necessários métodos analíticos sensíveis, reproduzíveis e validados, além de planos de amostragem adequados aos produtores e consumidores (MOSS, 1998).

A contaminação por micotoxinas geralmente ocorre em baixas concentrações nos cereais, exceto em situações particulares, onde o problema é decorrente da safra devido a chuvas, dificuldades com a colheita e armazenagem subsequente, quando então, podem ser observados níveis elevados. Assim, casos de micotoxicose aguda com sintomatologia e alterações anatomopatológicas evidentes, são menos freqüentes, predominando os efeitos crônicos, menos perceptíveis. Estes, entretanto, por serem

mais numerosos, determinam incalculáveis prejuízos à saúde animal com repercussão na economia agropecuária (CRUZ, 1996).

As aflatoxinas e a ocratoxina A (OTA) são as micotoxinas mais estudadas dentre as sintetizadas por espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Na produção da OTA, destaca-se o *A. ochraceus*, considerado o principal produtor em climas tropicais úmidos (PITT & HOCKING, 1997; MANTLE & CHOW, 2000). Entretanto, tem sido estabelecida a produção de OTA por diferentes espécies da seção Nigri, tais como o *A. niger* e o *A. carbonarius* (ABARCA et al., 2001; DALCERO et al., 2002; ROSA et al., 2002). Quanto às aflatoxinas, a literatura cita *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* como as principais espécies que as produzem (MOSS, 1998; SWEENEY & DOBSON, 1998).

2.4.1 Ocratoxina A

A OTA (Figura 1) é um pentacetídeo de fórmula $C_{20}H_{18}ClNO_6$, consiste em uma dihidroisocumarina ligada através de uma carboxila a um grupo P-fenilalanina (GROENE et al., 1996). Apresenta-se como um pó branco cristalino quando seca. Seu peso molecular é 403,84 daltons e possui o ponto de fusão estabelecido em 169°C (SCOTT, 1994). É pouco solúvel em água ($< 1 \text{ mg mL}^{-1}$) e tem solubilidade moderada em clorofórmio e metanol. Apresenta fluorescência sob luz ultravioleta verde e azul, quando em soluções ácidas e alcalinas, respectivamente (DRAGACCI, 1995).

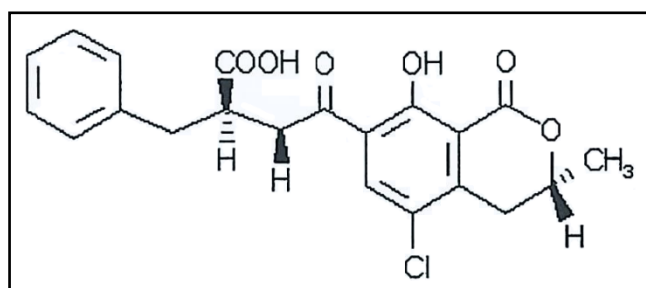


Figura 1. Estrutura da Ocratoxina A (OTA).

A OTA é uma potente nefrotoxina tendo o fígado como alvo secundário. Está correlacionada com a Nefropatia Micotóxica Suína, Aviária e ainda possivelmente, com a Nefropatia Endêmica dos Balcãs, caracterizada por progressiva redução das funções renais, freqüentemente é fatal. Dentre os animais de produção, os suínos são

os mais atingidos, seguidos pelas aves (SCUSSEL, 1998). A diferença na toxidez aguda da OTA para distintas espécies animais é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2. Toxidez aguda de ocratoxina A segundo KROGH (1992).

Espécies	DL ₅₀ (mg kg ⁻¹ de peso)	Via de administração
Camundongo, fêmea	22,0	ip
Rato, macho	28-30,3	oral
Rato, fêmea	21,4	oral
Rato, macho	12,6	ip
Rato, fêmea	14,3	ip
Cobaia, macho	9,1	oral
Cobaia, fêmea	8,1	oral
Galinha (White Leghorn)	3,4	oral
Peru	5,9	oral
Cão Beagle, macho	< 9 (dose total)	oral*
Suíno, fêmea	< 6 (dose total)	oral#

* Todos os três cães, que receberam diariamente 3 mg/kg de peso corporal, morreram dentro de 3 dias.

Suínos que receberam 2 mg/kg de peso corporal diariamente morreram dentro de 3 dias, enquanto os que receberam 1 mg/kg diariamente morreram dentro de 6 dias.

A Nefropatia Micotóxica Suína (NMS) é uma patologia renal caracterizada por degeneração dos túbulos e conseqüente inibição de sua atividade. Extensos estudos etiológicos têm revelado que a OTA é a maior causa de nefropatia em suínos (KROGH, 1992), embora outros fatores tais como a micotoxina citrinina possam estar envolvidos (ROSA et al., 1985). A patologia, tanto a de ocorrência natural como a experimentalmente induzida, tem sido amplamente estudada com relação aos aspectos clínicos, anátomo-histopatológicos e bioquímicos (FRIIS et al, 1969; ELLING & MOLLER, 1973; KROGH & ELLING, 1977; KROGH, 1992).

Segundo a Agência Internacional de Investigação Sobre o Câncer (IARC), a OTA foi classificada como pertencente à categoria 2b, isto é, um possível carcinógeno para o homem com evidências para animais (LEGARDA & BURDASPAL, 1998). Baseada na sua carcinogenicidade, a Organização Mundial de Saúde (WHO) propôs um limite máximo de OTA de 5 ng g⁻¹ (ppb) em cereais (ABARCA et al., 2001).

A OTA já foi detectada em soro sangüíneo de homens e mulheres (ZIMMERLI & DICK, 1995, UENO et al., 1998) e em leite humano (MIRAGLIA et al., 1998). Sua ingestão ocorre principalmente por alimentos vegetais como milho, café, cevada e

seus derivados (micotoxicose primária) e, através de resíduos e metabólitos presentes em alimentos de origem animal, como carne e patês (micotoxicose secundária).

Ao analisar 80 amostras de cervejas da Espanha, Alemanha, França e de outros sete países, LEGARDA & BURDASPAL (1998) encontraram uma incidência superior a 95% de OTA, em níveis que variaram de 0,005 a 0,121 ng mL⁻¹.

OLSSON et al. (2002) encontraram um nível de contaminação por OTA em cevada que variou em função do estado da amostra. Em amostras recebidas com odor normal a OTA não foi detectada, enquanto nas amostras que apresentavam alteração no odor os níveis variaram de 0 a 934 ng g⁻¹.

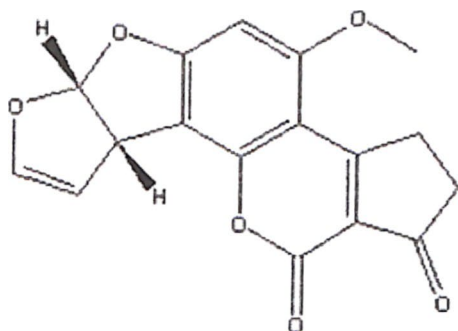
A radícula, subproduto da cevada, não tem sido investigada quanto à sua possível contaminação por micotoxinas.

A relativa estabilidade molecular da OTA lhe permite passar através da cadeia alimentar, ou seja, os produtos cárneos que contém a toxina são oriundos de animais alimentados com ração contaminada (MOSS, 1998). Geralmente, resíduos não são encontrados em ruminantes, devido ao fato de a OTA ser eliminada por enzimas produzidas pela microbiota ruminal formada por protozoários e bactérias (KROGH, 1992; CREPPY, 2002). Em animais monogástricos, como os suínos, resíduos têm sido detectados em vários tecidos, havendo uma alta correlação entre nível de OTA na ração e nível de resíduo nos rins, fígado, músculo e tecido adiposo. No sangue, a OTA encontra-se livre ou ligada à albumina. Esta ligação é particularmente forte em bovinos, suínos e humanos. Parece que a concentração no sangue é mais alta que em qualquer outro tecido (KROGH, 1992).

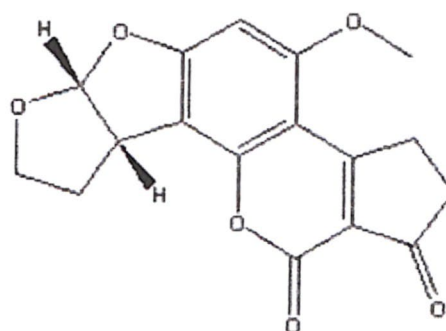
2.4.2 As aflatoxinas

As aflatoxinas são bisfuranocumarinas derivadas de um decacetídeo, pela via biossintética dos policetídeos, na qual a unidade C2 é perdida durante a formação dos anéis bisfuranos (SMITH & MOSS, 1985). As aflatoxinas contêm um núcleo cumarínico acoplado a um bisfurano e estes a uma pentanona (AFB₁ e AFB₂) ou a uma lactona (AFGI e AFG2) (Figura 2). As aflatoxinas B₁ e G₁ foram primeiramente descritas por NESBITT et al. (1962) e HARTLEY et al. (1963) sendo as B e G compostos dihidro derivados de B₁ e G₁, respectivamente descritas por ASAO et al. em 1963 e 1965.

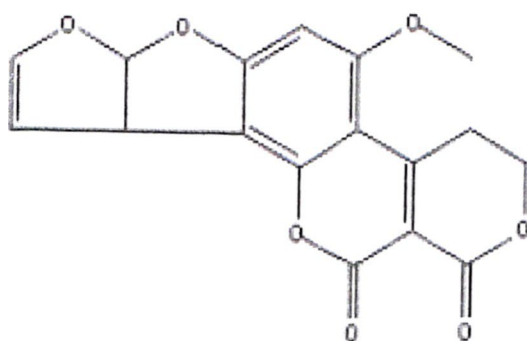
Os principais fungos aflatoxígenos são o *Aspergillus flavus* e o *Aspergillus parasiticus*. As amostras isoladas de *A. flavus* geralmente produzem aflatoxinas B₁ e B₂ e as de *A. parasiticus* com frequência são produtoras de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (DAVIS & DIENER, 1983). Através de estudos sobre a prevalência da contaminação de grãos por fungos aflatoxígenos verifica-se que há predominância do *A. flavus* sobre o *A. parasiticus* na maioria dos produtos analisados (LILLARD et al., 1970; KOEHLER et al., 1975; ROSA, 2002).



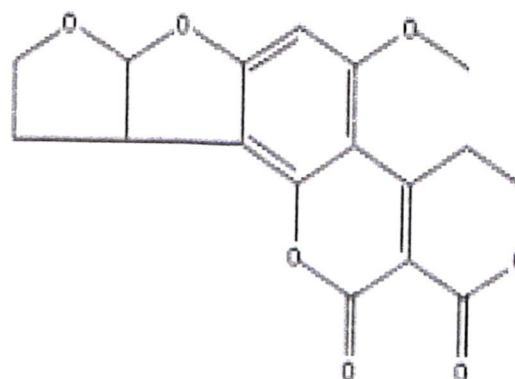
Aflatoxina B₁ (AFB₁)



Aflatoxina B₂ (AFB₂)



Aflatoxina G₁ (AFG₁)



Aflatoxina G₂ (AFG₂)

Figura 2. Estrutura química das principais aflatoxinas.

Os fungos aflatoxígenos podem invadir os cereais durante o crescimento, a estocagem e o seu processamento em produtos alimentícios e rações animais. Assim, milho, amendoim, centeio, sorgo, cevada, trigo, feijão, arroz e rações são excelentes substratos para o seu desenvolvimento (HERRY & LEMETAYER, 1992; WOOD, 1992; WOOD & POHLAND, 1992).

Produtos de origem animal também podem apresentar teores residuais de aflatoxinas, ativadas metabolicamente através do sistema misto oxidase (MFO) hepático do animal que as ingeriu, tais como a aflatoxina M₁ (AFM₁), o aflatoxicol (AFL), além da própria aflatoxina B₁ (AFB₁). A AFB₁ é a mais freqüente e mais tóxica, sendo conhecida como o mais potente hepatocarcinógeno de origem biológica para os animais (SMITH & MOSS, 1985). A toxidez aguda da AFB₁ para diferentes espécies animais, administrada via oral, é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3. Toxidez aguda de aflatoxina B₁ expressa por uma dose oral simples, de acordo com MOSS (2002).

Espécies	DL ₅₀ (mg kg ⁻¹ de peso)
Coelhos	0,3
Patos de 1 dia	0,34
Gatos	0,6
Suínos	0,6
Cães	0,5-1,0
Ovinos	1,0-2,0
Porquinho da índia	1,4-2,0
Frangos	6,3
Rato (macho)	5,5-7,2
Rato (fêmea)	17,9
Hamster	10,2

*A DL₅₀ corresponde à dose necessária para matar 50% da população estatisticamente significativa.

As aflatoxinas são hepatotóxicas e em baixas concentrações produzem alterações sobre o metabolismo, levando, lentamente, a sérios danos de saúde e perda na produtividade do animal. Os efeitos mais freqüentemente encontrados são a diminuição da velocidade de crescimento e da eficiência alimentar, causados pela redução do metabolismo protéico e absorção de gorduras, a supressão da resposta imune e a hepatocarcinogênese (CRUZ, 1996).

A quantidade de AFB₁ excretada no leite, como percentagem de AFB₁ presente na ração fornecida aos animais, é usualmente de 1-3%, entretanto valores tão altos quanto 6% têm sido reportados. Esta toxina pode ser detectada no leite 12-24 h após a primeira ingestão de AFB₁. Consiste em um risco principalmente para as crianças, por serem grandes consumidoras de leite e consideradas mais sensíveis aos efeitos adversos da toxina. Nas crianças, a capacidade para a biotransformação de carcinógenos é geralmente menor que em adultos (LÓPEZ et al., 2003).

2.4.3 Produção de Micotoxinas

O crescimento fúngico é dependente de uma série de fatores, tais como: atividade de água (Aa), temperatura, substrato e interações microbianas (ANDERSEN et al., 1996; LEE & MAGAN, 2000; MARTINS & MARTINS, 2002). A Aa é um dos principais fatores ambientais para controle do desenvolvimento fúngico e sua atividade metabólica (BRESLER et al., 1998), sendo considerado junto com a temperatura, os mais críticos durante a estocagem (MONTANI et al., 1988). Acredita-se que a fonte de nutrientes afeta a Aa mínima para o crescimento (WEARING & BURGESS, 1979) e estudos sobre substratos artificiais podem não representar a real capacidade de crescimento sobre um substrato natural (RAMOS et al., 1998).

Os fungos estão em contato direto com seus nutrientes no ambiente. Pequenas moléculas (tais como açúcares simples e aminoácidos) que estão em solução ao redor da hifa podem ser diretamente absorvidas. Grandes polímeros insolúveis tais como celulose, amido e proteínas precisam sofrer uma digestão preliminar para poderem ser aproveitadas, o que ocorre em função de enzimas extracelulares (por ex. celulase e amilase) (MOORE-LANDECKER, 1972).

O metabolismo secundário ocorre otimamente após a fase de crescimento balanceado podendo estar associado a mudanças morfogenéticas, tais como a

esporulação. Para a produção de micotoxinas além dos fatores já citados, há a dependência de estarem presentes cepas toxígenas, pois dentro de uma mesma espécie existem microorganismos produtores e não produtores de micotoxinas (SMITH & MOSS, 1985). Ainda segundo esses autores, a presença de insetos deve ser considerada por serem responsáveis por danos físicos aos grãos e, conseqüentemente, por facilitar a penetração fúngica. O uso de fungicidas pode estimular a produção pelos fungos resistentes e sobreviventes (GAREIS & CEYNOWA, 1994 apud D'MELLO & MACDONALD, 1997).

BACON et al (1973) analisando a produção de OTA por *Aspergillus ochraceus* em rações para aves, encontraram como melhor combinação neste substrato o uso de Aa 0,95 com temperatura de incubação de 30°C. RAMOS et al. (1998) obtiveram maior produção de OTA utilizando temperatura de 30°C em grãos de cevada com Aa 0,98.

A temperatura ótima para produção de aflatoxinas está entre 25 e 30°C (PITT & HOCKING, 1997). Utilizando a incubação de 30°C, MONTANI et al. (1988) verificaram que a melhor Aa para a produção de aflatoxinas em milho foi 0,90 , quando comparada a de 0,87 e 0,97 no mesmo substrato.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

As análises micológicas e micotoxicológicas foram realizadas nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas (NPM) do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizados no prédio do Projeto Sanidade Animal, convênio UFRRJ/Embrapa.

3.2 Amostras

Foram coletadas amostras correspondentes a média de expedição da radícula de cevada de um mês de produção, a partir de uma malteria de Taubaté-São Paulo, no período de julho de 2001 a dezembro de 2003. Enviadas ao laboratório e imediatamente processadas. Para os experimentos de produção de micotoxinas em radícula foi utilizada uma amostra de 5 kg de partida procedente da mesma malteria.

3.3 Espécies Fúngicas de Referência

As espécies fúngicas de referência foram cedidas pela micoteca do Departamento de Biologia do Instituto Oswaldo Cruz-RJ, originalmente obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), Maryland – USA; do Northern Regional Research Laboratory (NRRL), atual National Center For Agricultural Utilization Research – USA (NCAUR) e da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Brasil. As cepas produtoras de ocratoxina A foram: *Aspergillus carbonarius* (UFPE nº 1546 Catálogo URM 3ª ed., 1996), *A. niger* (ATCC 1004) e *A. ochraceus* (NRRL 3174). Para a produção de aflatoxinas foi utilizada a cepa de *A. flavus* (NRRL 5520).

3.4 Composição Nutricional da Radícula de Cevada

As análises percentuais das amostras de radícula de cevada foram realizadas no laboratório de Nutrição Animal do Instituto de Zootecnia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob a supervisão do professor Dr. Augusto Vital. Foi avaliada a proporção de matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta, matéria mineral e extrativo não nitrogenado. Amostras de cevada e malte também foram analisadas, visando verificar as mudanças no perfil constitucional.

3.5 Avaliação do Perfil Nutricional das Cepas de Referência pela Utilização de Compostos Carbonados

3.5.1 Hidrólise do amido

As cepas de referência foram avaliadas quanto à sua capacidade de produzir amilase, através da inoculação no meio com amido sólido em placa de Petri e líquido em tubo de ensaio (ver apêndice). A incubação foi efetuada a 25°C durante sete dias. Para a determinação da atividade amilolítica utilizou-se solução de lugol tanto para a cultura crescida em meio sólido como em meio líquido. Neste último, verificou-se também a produção de açúcar redutor através do método de Fehling e observou-se a produção de ácidos por adição de solução alcoólica a 1,6% de azul de bromotimol. Cada teste foi realizado em um tubo diferente (CRUZ, 1985).

3.5.2 Hidrólise da celulose

Empregou-se meio de cultura de Omelianski acondicionado em tubos de ensaio com rosca, o qual é isento de fonte de carbono. Este é suplementado por uma tira de papel de filtro estéril, que foi introduzido no meio após a semeadura do fungo. Os tubos, incubados a 25°C, foram observados semanalmente durante um período de quatro meses, havendo evaporação de líquido o volume inicial era completado com água destilada estéril. A hidrólise da celulose foi considerada positiva onde houve degradação da tira de papel. Verificou-se a presença de açúcares redutores pela utilização do reativo de Fehling (CRUZ, 1985).

3.6 Verificação da Capacidade Toxígena das Cepas de Referência

3.6.1 Produção de aflatoxinas e ocratoxina A

Foi utilizado o meio Agar coco (CAM) proposto por LIN & DIANESE (1976), empregando leite de coco comercial (marca Sococo), diluído em água destilada e acrescido de 1,2% de agar-agar para solidificação (GATTI et al., 2003). Antes da autoclavação a 120°C (Autoclave Vertical Phoenix mod. AV 75) por 15 minutos, foi feita a verificação do pH do meio, corrigindo quando necessário através da adição de HCL ou NaOH para 6,9, sendo então distribuído em placas de Petri estéreis.

A partir dos tubos de MEA (Agar Extrato de Malte) formulado de acordo com PITT & HOCKING (1997) removeu-se com o auxílio de alça de platina, fragmento da colônia que foi semeado no centro da placa de CAM. 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, quando verificou-se a presença de halo de fluorescência no meio.

3.6.2 Extração das micotoxinas

Após o crescimento dos fungos, a colônia e o meio ao seu redor foram recortados, triturados em gral e a toxina extraída pela adição de clorofórmio. O macerado foi filtrado obtendo-se o extrato clorofórmico que a seguir foi concentrado em Rotavapor (PEMEM BM- 102-ER) a um volume final de aproximadamente 2 mL.

3.6.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

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 eqüidistantes. Utilizou-se a fase móvel composta por: tolueno: clorofórmio: acetato de etila: ácido fórmico (70: 50: 50: 10 v/v) de acordo com GIMENO (1980). Os padrões utilizados de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e OTA foram preparados de acordo com as recomendações adotadas pela AOAC (1990).

Após o desenvolvimento por 50 min. em cromatotânque saturado, a cromatoplaça foi observada em cromatovisor sob radiação UV de 365nm, para evidênciação das manchas fluorescentes características.

Os mesmos extratos empregados na CCD, foram filtrados em membrana Millipore® de 0,22 µ e avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As etapas de extração das toxinas e CCD foram realizadas em capela de exaustão de gases tóxicos (ENGELAB).

3.7 Produção Experimental de Aflatoxinas e Ocratoxina A na Radícula de Cevada

3.7.1 Preparo do inóculo

Foram feitas suspensões em água peptonada 0,1% estéril das cepas de referência cultivadas em tubo com meio MEA inclinado. A partir dessas suspensões, homogeneizadas por agitador de tubos tipo Vortex (sem marca, Industria Brasileira), alíquotas de 1 mL foram inoculadas em placas de Petri com MEA, usando a técnica de Plaqueamento de superfície. Após sete dias de incubação a 25°C, foram selecionadas placas com crescimento homogêneo, das quais retirou-se assepticamente “plugs” com 5 mm de diâmetro (RAMOS et al., 1998; VELLUTI et al., 2000), para serem inoculados nos frascos Erlenmeyer com a radícula estéril como substrato a ser testado.

3.7.2 Substrato

Frascos Erlenmeyer com capacidade de 500 mL, contendo 25 g de radícula de cevada cada, foram autoclavados a 120°C por 20 minutos, para garantir eliminação da microbiota inicial. As amostras foram submetidas à pesquisa prévia de micotoxinas.

A verificação da atividade de água (Aa) foi realizada através do equipamento Aqualab CX 2 com condicionamento de temperatura (Braseq), utilizando metodologia descrita pelo fabricante. Como não se teve acesso ao isoterma de sorção de água específico para radícula de cevada, foi feita uma adição seriada de água destilada para verificar quanto seria necessário acrescentar aos 25 g da radícula para atingir a Aa desejada. Para equilibrar a Aa as amostras foram armazenadas sob refrigeração por 48 horas, com homogeneização periódica conforme recomendado por RAMOS et al. (1998) e LEE & MAGAN (2000). Utilizou-se 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mL de água, o que correspondeu a 0,79; 0,82; 0,91; 0,93; 0,94 e 0,95 de Aa, respectivamente. Foram selecionadas três Aa (0,82; 0,91 e 0,95).

3.7.3 Inoculação e incubação

As cepas de referência foram inoculadas através de “plugs” de 5 mm de diâmetro cada e os frascos incubados em Estufas BOD (Ética - São Paulo, Brasil), ajustadas para as temperaturas de 25 e 30°C. Para verificar efeito do tempo sobre crescimento e Produção das micotoxinas, foram feitas avaliações em três períodos de incubação diferentes (7, 14 e 21 dias). Todo o experimento foi conduzido em duplicata.

3.7.4 Extração de micotoxinas na radícula

Utilizou-se a metodologia de extração de micotoxinas proposta por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989), com modificações. Assim, o tempo de extração foi prolongado para 60 min. de agitação em “shaker” (Orbit Shaker da Lab-Line Instruments - USA, modelo nº 3520) com 200 rotações por minuto. Todos os reagentes foram empregados pela metade, para que fosse mantida a mesma proporção descrita na metodologia original. Esta redução foi proporcional para 25 g de radícula. O extrato clorofórmico obtido foi evaporado até o volume de 1,5-2,0 mL a 60°C em rotavapor. Posteriormente, este volume foi filtrado através de membrana Millipore® de 0,22 µ, sendo acondicionado em frasco âmbar, onde todo o volume foi seco sob fluxo de nitrogênio e, armazenado em freezer até a etapa de detecção.

3.7.5 Detecção da aflatoxina B₁

Os extratos de *A. flavus* foram ressuspensos com 500 µL de clorofórmio. Foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (Waters Associates®, Inc., Miliford, M.A. – EUA) equipado com duas bombas Waters (modelo 510), 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. 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 aflatoxina B₁ (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 µg mL⁻¹) por Espectrofotômetro Shimadzu mod. 2001 (Shimadzu Co.®, Kyoto, Japão), o padrão de AFB₁ foi armazenado em frasco âmbar e mantido em freezer a -18°C. A fase móvel para CLAE em fase normal foi acetato de etila: n-hexano (3:2,5 - v/v), com fluxo de 1,5 mL/min.

Os testes comprobatórios foram realizados por co-injeção e análise espectroscópica com UV do pico obtido por detector de arranjo de diodos L-3000 Merck-Hitachi, (Hitachi Ltd.®, Japão) equipado com Workstation com software de controle D-6.

3.7.6 Detecção da ocratoxina A

Os extratos de *A. ochraceus* foram ressuspensos usando 500 µL da fase móvel, composta de uma solução de metanol: 9% ácido acético em água, pH 2,3 (72:28 – v/v). Foi utilizado o mesmo equipamento para CLAE descrito acima, com detector de fluorescência Waters (modelo 420) e de absorvância Lambda-Max Waters (modelo 481) equipado com filtro de excitação de 330 nm e de emissão de 460 nm., integrador registrador Waters (modelo 740). As separações foram realizadas em coluna analítica de octadecilssilano Microsorb MV C18 (VARIAM™, Walnut creek, CA - EUA) de 250 x 4,6 mm i.d., com partícula 5 µ de diâmetro. O padrão de ocratoxina A (Sigma Co, St. Louis – EUA) foi diluído em benzeno:ácido acético (90:10, v/v) de acordo com AOAC (1990) e preparada uma solução padrão estoque a uma concentração de 51,36 µg mL⁻¹. Foi usado um fluxo de 0,5 mL/min.

Os testes comprobatórios foram realizados por co-injeção. A quantificação dos extratos foi possível através da comparação da área do pico do extrato com o do padrão. Os picos das toxinas foram validados baseando-se no critério de relação de altura mínima 3:1 (sinal:ruído).

Os solventes utilizados tanto na cromatografia quanto no preparo dos padrões foram de grau Uvasol ou LiChrosorb (Merck®-Quimitra- Rio de Janeiro, Brasil) e submetidos à filtração, antes do uso, em membrana Millipore (Millipore®, Bedford, MA – EUA) tipo GVWP0047 de 0,47 µ de diâmetro de poro. A água empregada foi purificada em sistema Milli-Q®.

Nos extratos de *A. niger* referentes ao período de incubação de 7 dias a OTA não foi detectada por CLAE. Assim, nas análises subsequentes foi empregada apenas a cromatografia em camada delgada como procedimento de triagem. Como a OTA não foi detectada em nenhuma das amostras, a quantificação por CLAE não foi realizada.

3.7.7 Fator de recuperação

Amostras de radícula de cevada, em frascos Erlenmeyer de 500 mL, foram fortificadas com soluções padrão de AFB₁ e OTA para concentrações de 25, 50 e 150 ng g⁻¹. As amostras fortificadas foram analisadas em duplicata. Após evaporação do solvente do padrão, deu-se início aos processos de extração: método com 100 mL de clorofórmio para cada 25 g da radícula, com agitação por 60 minutos (SABINO &

CORRÊA, 1981 método citado por SOARES & RODRIGUES-AMAYA com 50 g da radícula (1989); método anterior com metade do tamanho da amostra a ser extraída e metade de todos os reagentes e, ainda a metade da amostra e dos reagentes com aumento do tempo de extração para 60 minutos sob agitação. A recuperação foi calculada para cada método de extração, a quantificação foi realizada por CLAE.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de composição nutricional realizada em amostras de radícula de cevada, cevada e malte forneceu os valores percentuais de matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta, matéria mineral e carboidratos solúveis, cujos resultados encontram-se na Tabela 4. Observa-se que a proporção de proteína é bem superior na radícula, quando comparada a encontrada tanto na cevada quanto no malte. Esta quantidade de proteína é que evidencia a radícula em um bom substrato para a alimentação animal.

Tabela 4. Resultado da análise percentual da composição nutricional das amostras de cevada, malte e radícula.

Análise (%)	Cevada	Malte	Radícula
Matéria seca	88,83	94,14	92,72
Proteína bruta	8,85	9,52	21,68
Extrato etéreo	1,75	1,77	1,25
Fibra Bruta	4,07	4,06	11,69
Matéria mineral	1,81	1,94	6,49
Extrativo não nitrogenado*	72,35	76,85	51,61

* Carboidratos solúveis

A avaliação da capacidade celulolítica das cepas de referência testadas, quando semeadas em meio Omelianski, mostrou que todas foram capazes de degradar a celulose até açúcar redutor, apesar de *Aspergillus flavus* (NRRL 5520) ter apresentado pouco crescimento após 120 dias de incubação a 25°C. A Figura 3 mostra o crescimento de *A. niger* (ATCC 1004) e *A. ochraceus* (NRRL 3174) sobre a fita de papel (fonte de celulose), no meio Omelianski.

Quanto à capacidade de produzir amilase, apenas o *A. niger* mostrou-se negativo. Entretanto, somente o *A. flavus* foi positivo para açúcares redutores (Tabela 5). O acesso aos açúcares redutores (monossacarídeos como a glicose e alguns dissacarídeos) é necessário, pois segundo SMITH E MOSS (1985) a glicólise precisa ocorrer para que exista uma quantidade suficiente de acetil COA disponível para a biossíntese dos policetídeos, conseqüentemente para a formação tanto das aflatoxinas quanto da ocratoxina.

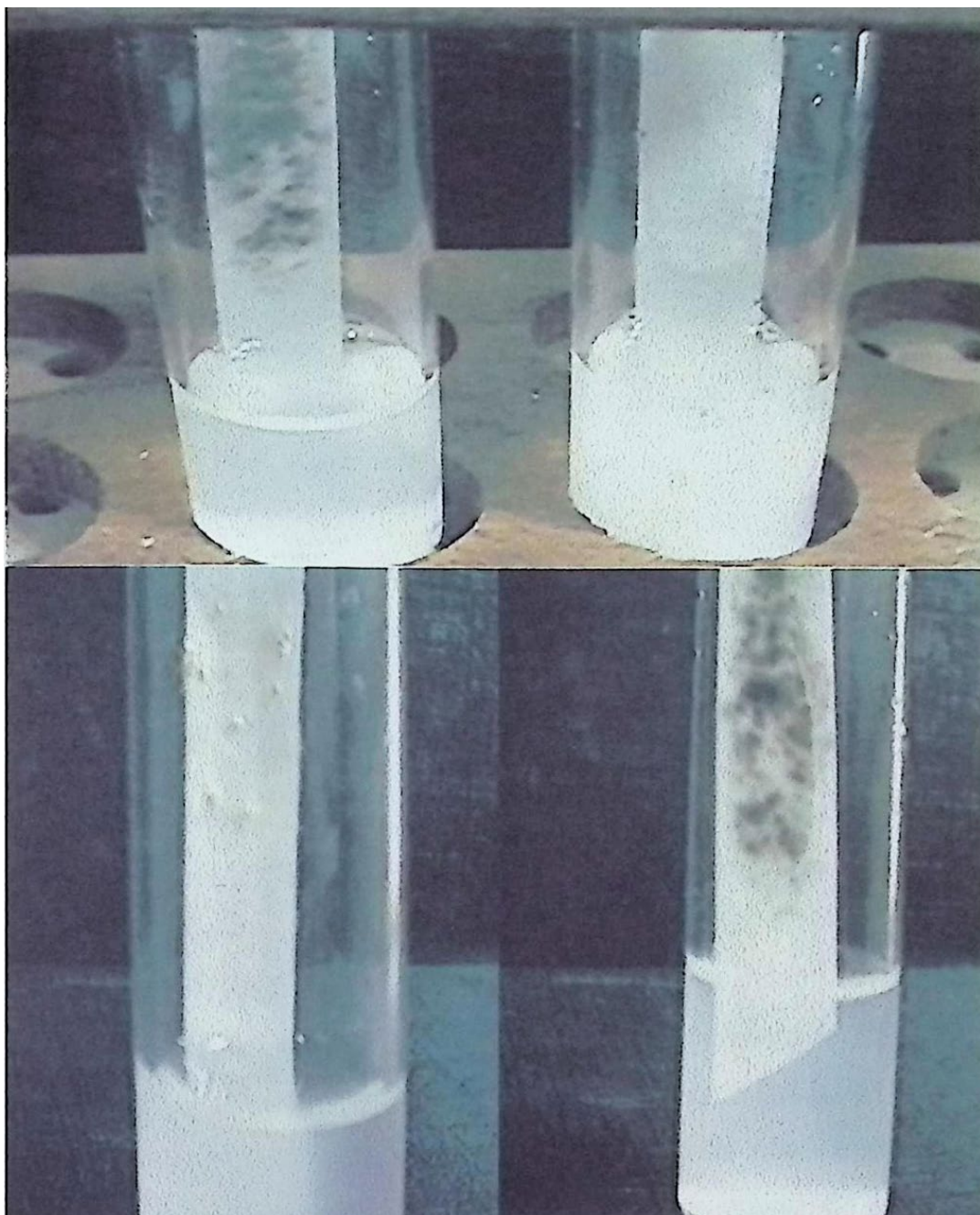


Figura 3. Verificação da utilização da celulose, em meio Omelianski de tira de papel de filtro: (A) tubo com crescimento positivo (o da esquerda) e tubo negativo (o da direita); (B) *Aspergillus ochraceus* (NRRL 3174) positivo; (C) *A. niger* (ATCC 1004) positivo.

Tabela 5. Utilização de compostos carbonados pelas cepas fúngicas de referência do gênero *Aspergillus* testadas.

Fungos	Celulase	Açúcar redutor	Amilase	Açúcar redutor
<i>A. carbonarius</i>	+	+	+	-
<i>A. flavus</i>	+	+	+	+
<i>A. niger</i>	+	+	-	-
<i>A. ochraceus</i>	+	+	+	-

+ Hidrólise ou presença

- Não hidrólise ou ausência

Como heterotróficos os fungos requerem compostos orgânicos para a síntese de biomassa (anabolismo) e para produzir a energia que dirige essas reações (catabolismo), ambos referidos como metabolismo primário (SMITH & MOSS, 1985). Segundo GRIFFIN (1994), o metabolismo secundário freqüentemente ocorre após o crescimento ter estacionado devido a limitação de nutrientes, mas com excesso de fontes de carbono disponíveis. Nos testes de produção de amilase, foi utilizado um período de 7 dias de incubação. É possível que este intervalo de tempo não tenha sido suficiente para que o fungo *A. niger* demonstrasse sua capacidade amilolítica, apesar de ser uma espécie muito utilizada industrialmente por esta característica. Pois de acordo com GRIFFIN (1994) alguns fungos necessitam de um período maior de adaptação ao substrato.

A avaliação do perfil toxígeno das cepas de referência em Agar Coco (CAM) mostrou que *A. flavus* foi produtor de AFB₁, o *A. ochraceus* e o *A. niger* produziram OTA, enquanto o *A. carbonarius* (UFPE 1546) não se mostrou toxígeno (Tabela 6). Os resultados obtidos de produção das aflatoxinas estão de acordo com a literatura (DAVIS & DIENER, 1983; GATTI et al., 2003; VAAMONDE et al., 2003) a qual cita que o *A. parasiticus* é capaz de produzir as aflatoxinas dos tipos B e G, enquanto geralmente o *A. flavus* apenas produz as aflatoxinas do tipo B.

A utilização do meio Agar coco proposta por LIN & DIANESE (1976) para a caracterização de fungos aflatoxígenos, teria inicialmente seu uso limitado a estes fungos. Entretanto, sua aplicabilidade tem sido ampliada, já sendo conhecida sua utilidade na verificação de fungos produtores de citrinina (CRUZ et al., 1992) e ocratoxinas (HEENAN et al., 1998).

Tabela 6. Teste de fluorescência em meio agar coco e confirmação da produção de toxina pelas cepas de referência por cromatografia em camada delgada (CCD).

Fungos	Fluorescência	Toxina/ CCD
<i>A. carbonarius</i>	-	-
<i>A. flavus</i>	+ (azul)	AFB ₁
<i>A. niger</i>	+ (esverdeada)	OTA
<i>A. ochraceus</i>	+ (esverdeada)	OTA
+ positiva		
- negativa ou não detectada		

Os resultados de perfil toxígeno foram obtidos por fluorescência em CAM e por CCD. A necessidade de confirmação da toxina produzida no meio CAM, através de análises cromatográficas complementares foi relatada por CRUZ (1997) e GATTI et al. (2003), estes últimos verificaram que a ausência de fluorescência em CAM não implica em caráter atoxígeno. O único fungo, neste experimento, a não apresentar fluorescência em CAM foi o *A. carbonarius*, a partir do qual também não foi detectada a toxina através de CCD. Desta forma, o *A. carbonarius* foi excluído do experimento de avaliação do substrato radícula para a produção das micotoxinas testadas.

Seguindo recomendações da literatura (SOARES, 2003) foi feita a validação do método de extração de micotoxinas intralaboratorialmente. Foram selecionados quatro Processos de extração: utilizando 100 mL de clorofórmio para cada 25 g da radícula com agitação por 60 minutos (SABINO & CORRÊA, 1981); método citado por SOARES & RODRIGUES-AMAYA (1989); método anterior com metade do tamanho da amostra a ser extraída e metade de todos os reagentes e, ainda também utilizando a metade da amostra e dos reagentes com aumento do tempo de extração para 60 minutos sob Através da adição dos padrões de OTA e AFB₁ foi feita a recuperação dos métodos citados acima. O último foi o selecionado para este experimento por ter apresentado o melhor resultado, obtendo uma recuperação média

de 86% e de 82% para amostra de radícula com 150 ng g⁻¹ de AFB₁ e 150 ng g⁻¹ de OTA, respectivamente. Esta recuperação pode ser considerada boa de acordo com HORWITZ & ALBERT (1991), os quais aceitam recuperações superiores a 60% como válidas.

Entre o período de julho de 2001 e dezembro de 2003, foram feitas pesquisas de micotoxinas na radícula. A partir de um total de 30 amostras analisadas apenas uma apresentou concentração traço de ocratoxina A (>0,7 ng g⁻¹), em todas as amostras restantes não foram detectadas micotoxinas. Estas amostras vieram diretamente da malteria e encontravam-se armazenadas com baixa atividade de água (ao redor de 0,53). A grande preocupação com este substrato é o período de armazenagem, principalmente quando realizado nos estabelecimentos destinados à criação de suínos e bovinos, os quais podem não apresentar um controle adequado.

No experimento para avaliar a capacidade da radícula de cevada como substrato para a produção de micotoxinas, foi constatada sua condição para a produção de AFB₁ pela cepa de *A. flavus* (NRRL 5520), mas principalmente, para a síntese de OTA pela cepa de *A. ochraceus* (NRRL 3174). Os valores médios de produção encontram-se na Tabela 7. Os cromatogramas no sistema CLAE dos extratos do experimento de produção de AFB₁ e OTA estão exemplificados nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Tabela 7. Produção média de AFB₁ e OTA sobre radícula com diferentes atividades de água, inoculada com espécies de *Aspergillus* e incubada a 25 e 30°C, após três períodos de incubação (7, 14 e 21 dias).

Espécies de <i>Aspergillus</i>	Aa	Concentração da toxina (ng toxina / g de radícula)					
		25°C			30°C		
		7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
<i>A. flavus</i>	0,82	48,47	176,65	45,49	23,72	44,76	90,85
(NRRL 5520)	0,91	135,16	39,56	60,83	27,00	19,53	58,15
AFB ₁	0,95	136,57	93,00	1150,83	15,59	18,63	35,91
<i>A. ochraceus</i>	0,82	3103,55	28877,01	22120,37	683,22	27995,55	24910,36
(NRRL 3174)	0,91	16294,56	7284,75	5197,64	9441,56	5475,60	4399,56
OTA	0,95	9035,52	7209,40	9473,42	2281,98	295393	2627,66
<i>A. niger</i>	0,82	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(ATCC 1004)	0,91	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OTA	0,95	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = Não detectada

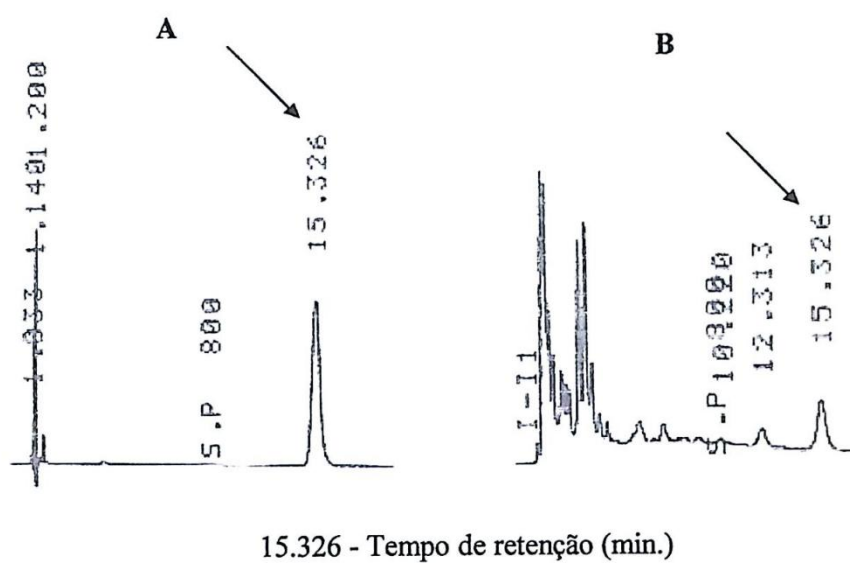


Figura 4. Cromatogramas: (A) padrão de AFB₁ com 10,4 µg mL⁻¹; (B) amostra de radícula de cevada com Aa 0,95 inoculada com *Aspergillus flavus* (NRRL 5520) e incubada a 25°C por sete dias. Detector Merck-Hitachi UV-VIS L-4250 ajustado para comprimento de onda de 350 nm. Coluna: Sílica de 150 x 4,6 mm i.d. Fase móvel composta por acetato de etila: n-hexano (3: 2,5, v/v), com fluxo de 1,5 mL/min.

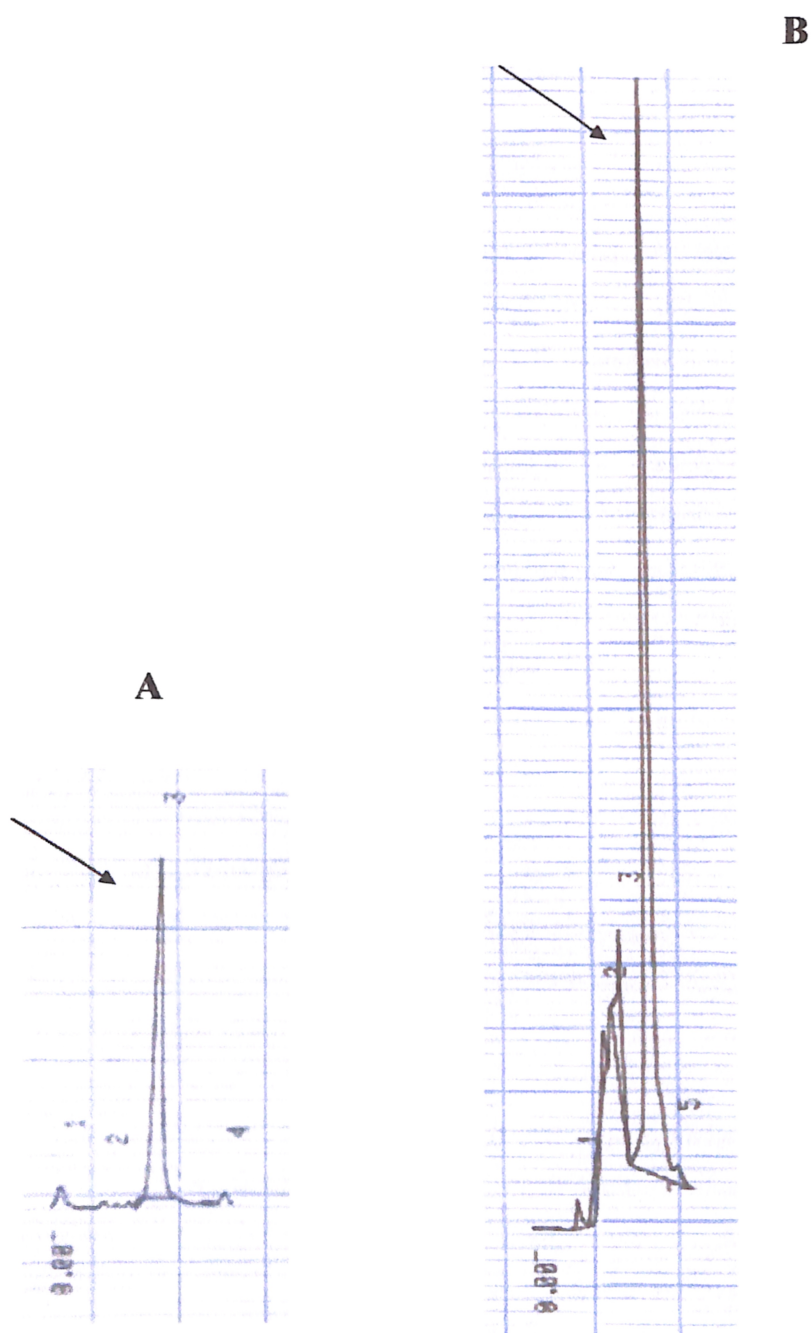


Figura 5. Cromatogramas: (A) padrão de OTA com $51,36 \mu\text{g mL}^{-1}$; (B) amostra de radícula de Cevada com Aa 0,91 inoculada com *Aspergillus ochraceus* (NRRL 3174) e incubada a 30°C por 14 dias. Detector de fluorescência Waters (modelo 420) e de absorvância Lambda-Max Waters (modelo 481) equipado com filtro de excitação de 330 nm e de emissão de 460 nm. Coluna: Octadecilssilano Microsorb MV C18 de 250 x 4,6 mm id. Fase móvel: metanol: 9% ácido acético em água Milli-Q, pH 2,3 (72: 28 - v/v) com um fluxo de 0,5 mL/min.

A produção de AFB₁ pela cepa de *A. flavus* foi analisada em três diferentes condições de atividade de água (Aa) e duas temperaturas de incubação. Dentre as amostras incubadas a 25°C as que tinham Aa inicial 0,95 alcançaram a maior produção média (1151 ng g⁻¹) aos 21 dias após a inoculação (Figura 6A). BRESLER et al. (1998) também obtiveram o máximo de produção de aflatoxina aos 21 dias, ao avaliar grãos de amaranth incubados a 25°C com Aa 0,90. No entanto, sob a temperatura de 30°C, a Aa 0,82 mostrou-se mais adequada à produção de AFB₁ na radícula, alcançando a concentração média de 91 ng g⁻¹ também aos 21 dias de incubação (Figura 6B), O que está de acordo com a literatura (PITT & MICAMBLE, 1995), a qual cita que com o aumento da temperatura há uma diminuição da Aa mínima necessária ao desenvolvimento do *A. flavus*.

Os níveis de aflatoxina produzidos foram mais baixos sob a temperatura de incubação de 30°C, independente da Aa inicial utilizada. Essa concentração mais baixa pode ser atribuída ao mais rápido uso do substrato para o desenvolvimento micelial e crescimento fúngico (ELLIS et al., 1993).

Ao comparar os níveis de AFB₁ produzidos na radícula com aqueles encontrados no milho por MONTANI et al. (1988) sob condições similares de incubação, os quais Verificaram a produção de mais que 200.000 ng g⁻¹ com Aa 0,90 e mais que 20.000 ng g⁻¹ a 0,87 após 16 dias a 30°C, pode-se considerar a radícula pobre substrato para a produção de aflatoxina. Entretanto, uma conclusão mais segura requer a utilização de um número maior de cepas fúngicas aflatoxígenas, pois diferenças na produção podem ser atribuídas à cepa fúngica utilizada (BRESLER et al., 1998).

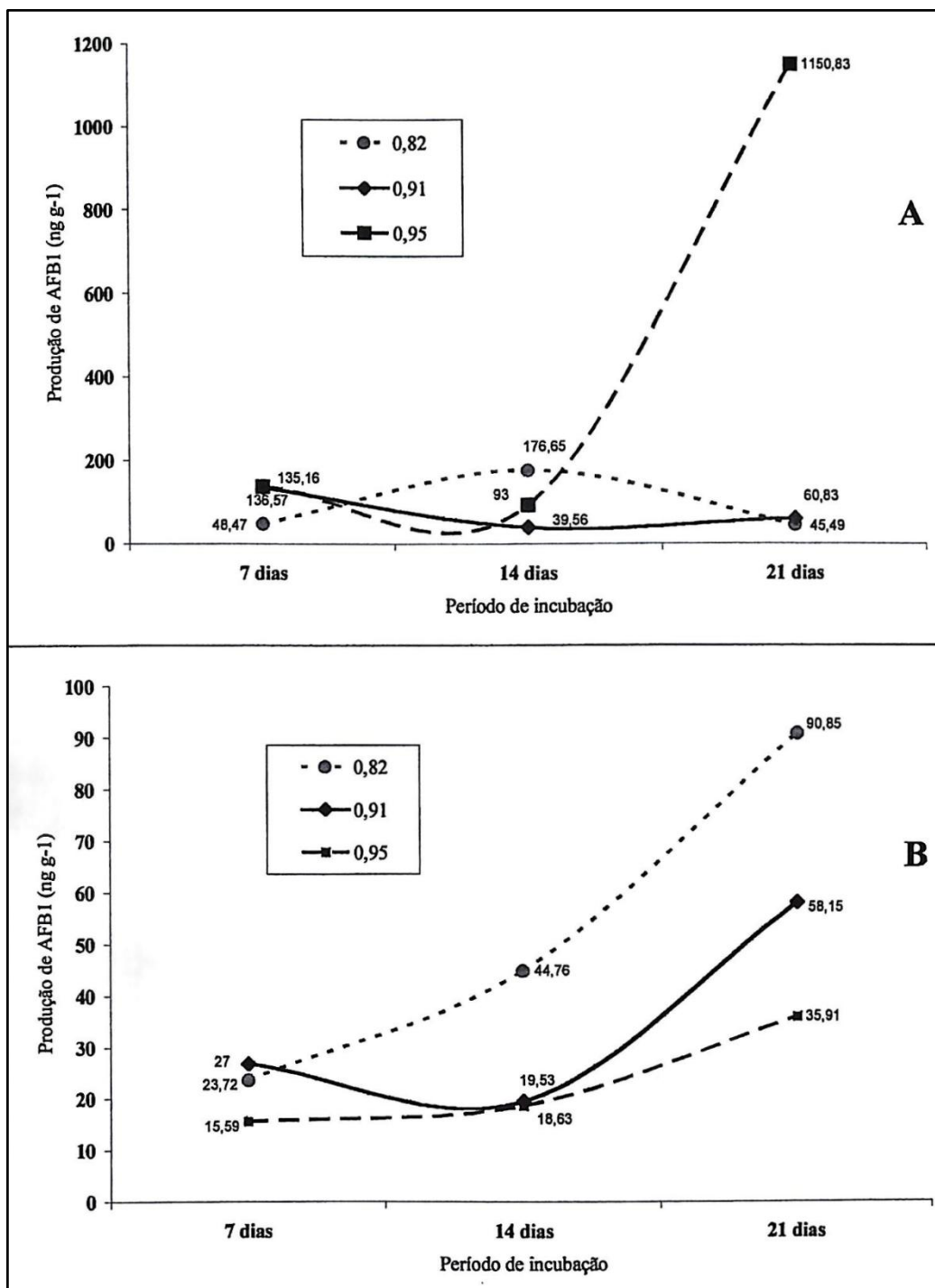


Figura 6. Produção de AFB₁ por *Aspergillus flavus* (NRRL 5520), sob três diferentes condições de Aa: (A) quando incubado a 25°C; (B) incubado a 30°C.

A produção de OTA pela cepa de *A. ochraceus* também foi avaliada sob diferentes condições de Aa e temperatura. Para esta toxina, a Aa inicial de 0,82 mostrou-se melhor para a produção, em ambas temperaturas de incubação (25 e 30°C). E, as maiores concentrações foram atingidas aos 14 dias após inoculação (Figura 7A e B). BACON et al. (1973) sugerem que a produção de OTA ocorre próximo às condições ótimas de crescimento do *A. ochraceus*, que corresponde a uma temperatura de 24-3 IOC (PITT & HOCKING, 1997). As temperaturas de incubação utilizadas neste experimento encontram-se no intervalo descrito acima e, permitiram a produção de OTA em concentrações de até quase 30.000 ng g⁻¹ de radícula, ou seja, quase 30 ppm (partes por milhão).

Segundo WEARING & BURGESS (1979) e MOSS (1996) a fonte de nutrientes afeta a Aa mínima para o crescimento fúngico. Foi observado que para o substrato radícula de cevada a Aa mais baixa (0,82) foi o suficiente para a produção das micotoxinas avaliadas, o que torna ainda mais necessário o controle da umidade. O tempo de incubação também é um fator a ser considerado, RAMOS et al. (1998) Obtiveram uma produção máxima de OTA em grãos de cevada, com Aa 0,98 após três semanas de incubação. No entanto, neste experimento a maior produção de OTA ocorreu após duas semanas e com uma Aa bem mais baixa (0,82).

O *A. niger* (ATCC 1004) não produziu OTA na radícula, durante todo o período do experimento, apesar de ter apresentado excelente conidiogênese (crescimento) nas diferentes condições de Aa. A correlação entre esporulação e formação de toxina também não foi verificada por VELLUTI et al. (2000) ao avaliar o crescimento de espécies de *Fusarium*. O *A. niger* não sintetizou a toxina na radícula embora a tenha Produzido no meio Agar coco. Isto pode ser explicado por uma possível perda da capacidade amilolítica, como verificado na análise nutricional das cepas.

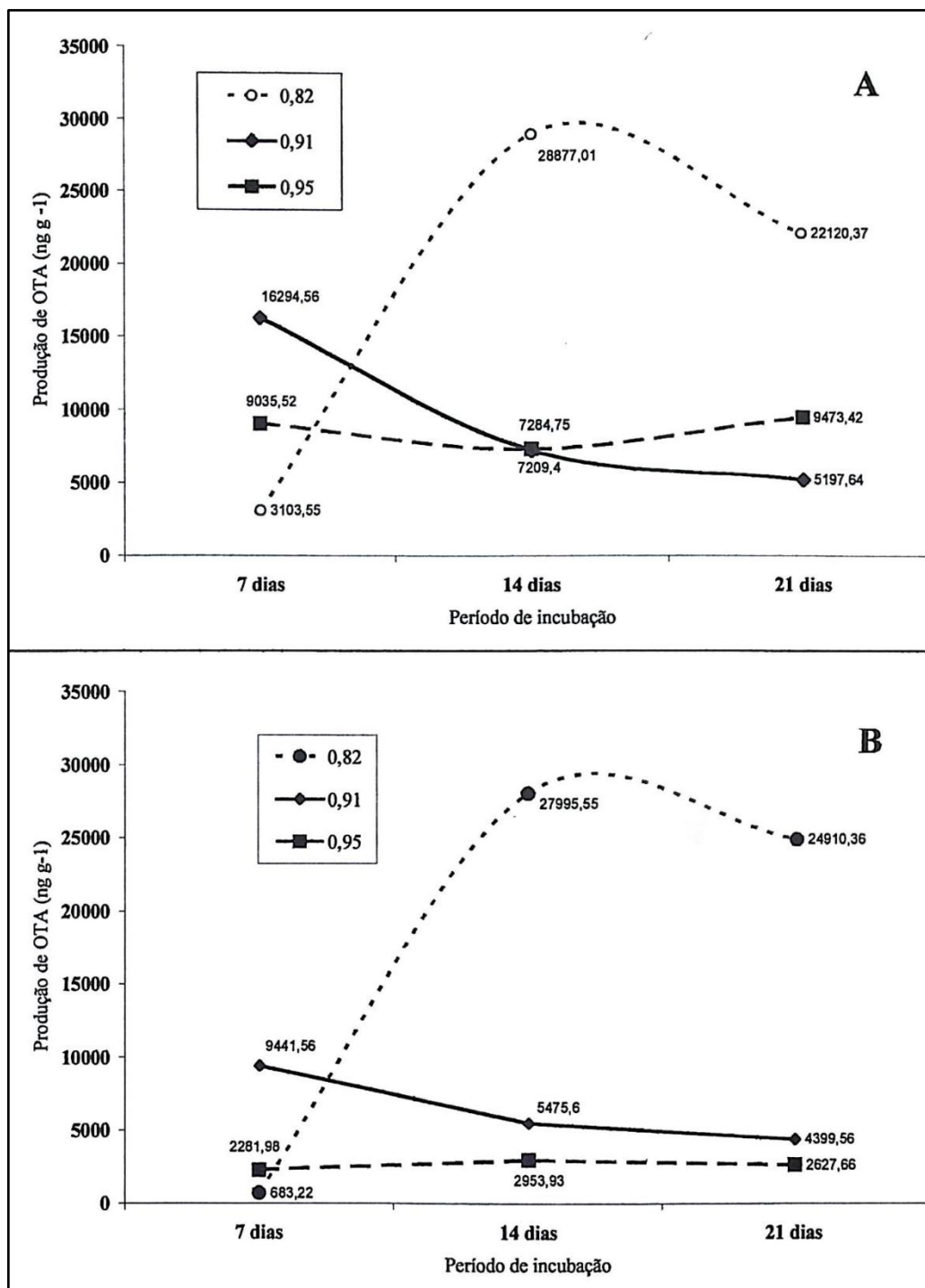


Figura 7. Produção de OTA por *Aspergillus ochraceus* (NRRL 3174), sob diferentes condições de Aa: A- incubado a 25°C; B-incubado a 30°C.

A contaminação dos alimentos por fungos toxígenos é um fato preocupante, de tal maneira que, tem-se implementado medidas de controle destes em alimentos e rações animais. O fato de ter ocorrido a produção das micotoxinas na radícula em concentrações de até ppm, justifica a preocupação de que havendo a produção em pequenos pontos isolados, possa ocorrer a contaminação de todo um lote, quando realizada a mistura do material.

Os cuidados com a armazenagem dos alimentos destinados aos animais, principalmente por aqueles em regime de confinamento, devem ser rigorosos mesmo para substratos inicialmente secos, tais como a radícula de cevada. Eles são necessários para se evitar surtos de micotoxicoses, como o descrito por ROSA et al. (1985), que ocorreu em criação de suínos devido à ingestão de cevada contaminada com a micotoxina citrinina. Neste experimento trabalhou-se com elevação da Aa inicial, isto significa que se em algum momento do transporte ou armazenamento da radícula ocorrer uma elevação da umidade, esta pode favorecer a produção de micotoxinas, comprometendo a qualidade do alimento.

O conhecimento da micobiota toma importância na medida em que a adição da radícula à ração animal possa servir de inóculo. Paralelo a este experimento deu-se início a um levantamento da micobiota contaminante deste substrato.

Neste estudo foi verificado que o substrato radícula de cevada fornece condições para o desenvolvimento fúngico e a produção de AFB₁ e OTA. Entretanto, serão necessários mais estudos utilizando um maior número de temperaturas de incubação e Aa mais baixas, a fim de verificar o limiar para o crescimento fúngico e produção das micotoxinas, inclusive verificando a produção das micotoxinas sob influência da variação de pH. Tais estudos são necessários para a elaboração das melhores medidas de controle. Segundo ABARCA et al. (2001), o mais efetivo método para proteger os consumidores dos efeitos tóxicos de AFB₁ e OTA é realizar boas práticas para prevenção do crescimento fúngico e da formação destas micotoxinas durante a produção e processamento do alimento.

5 - CONCLUSÕES

1. *Aspergillus flavus* (NRRL 5520) foi produtor de AFB₁ quando cultivado em Agar coco (CAM), *A. ochraceus* (NRRL 3174) e *A. niger* (ATCC 1004) produziram OTA em meio CAM e, *A. carbonarius* (UFPE 1546) mostrou-se atoxígeno em CAM.
2. Todas as cepas de referência utilizadas foram celulolíticas em meio de Omelianski, chegando até açúcar redutor (Fehling +).
3. *A. flavus*, *A. carbonarius* e *A. ochraceus* foram amilase +, enquanto o *A. niger* não se mostrou amilolítico.
4. O método de extração sugerido por SOARES & RODRIGUES-AMAYA (1989), com modificações, apresentou adequada recuperação para a radícula de cevada.
5. De 30 amostras de radícula analisadas, no período de julho de 2001 a dezembro de 2003, apenas uma apresentou concentração traço de ocratoxina A ($> 0,7 \text{ ng g}^{-1}$), em todas as amostras restantes não foram detectadas micotoxinas.
6. O *A. carbonarius* (UFPE 1546) não foi usado na avaliação da radícula de cevada como substrato para produção de micotoxinas, por ter se mostrado atoxígeno em CAM.
7. O *A. niger* (ATCC 1004) não produziu OTA na radícula durante todo o período do experimento.
8. A radícula permitiu a produção de AFB₁ pela cepa de *A. flavus* (NRRL 5520) a partir dos sete dias de incubação, atingindo o máximo aos 21 dias.
9. A radícula mostrou-se um bom substrato para a produção de OTA pela cepa *A. ochraceus* (NRRL 3174), a partir dos sete dias, com máximo de produção observado aos 14 dias de incubação.
10. No substrato seco (Aa ao redor de 0,53), micotoxinas não foram detectadas. Entretanto, uma Aa de 0,82 permitiu a produção em concentrações de até ppm.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R.; CABAÑES, F.J. (2001) Current importance of Ochratoxin A - Producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*, 64 (6): 903-906.
- ALDERSEN, B.; THRANE, U.; SVENDSEN, A.; RASMUSSEN, A. (1996) Associated field mycobiota on malt barley. *Can. J. Bot.*, 74: 854-858.
- AOAC-Association Official Analytical Chemistry (1990) Mycotoxin Methods. *J. AOAC*, 15^a ed.
- ASAO, T.; BUCHI, G.; KADDER, M.M.A.; CHANG, S.B.; WICK, E.L.; WOGAN, G.N. (1963) Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 1706-1707.
- ASAO, T.; BUCHI, G.; KADDER, M.M.A.; CHANG, S.B.; WICK, E.L.; WOGAN, G.N. (1965). The structures of aflatoxin B₁ and G₁. In: *Mycotoxins in foodstuffs*. 265 - 273p, M.I.T. Press.
- AYERST, G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Jour. Store Prod. Res.*, 5: 669-687.
- BACON, C.W.; SWEENEY, J.G.; ROBBINS, J.D.; BURDICK, D. (1973) Production of Penicillic Acid and Ochratoxin A on Poultry Feed by *Aspergillus ochraceus*: Temperature and Moisture Requirements. *Applied Microbiology*, 26 (2): 155-160.
- BRESLER, G.; VAAMOND, G.; DEGROSSI, C.; PINTO, V. F. (1998) Amaranth grain as substrate for aflatoxin and zearalenone production at different water activity levels. *Int. J. Food Microbiol.*, 42: 57-61.
- CHRISTENSEN, M. (1981) A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, 73: 1056-1084.
- CLARKE, J.H. & HILL, S.T. (1981) Mycofloras of moist barley during sealed storage in farm and laboratory silos. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 77 (2): 557-565.
- CREPPY, E.E. (2002) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Review article. *Toxicology Letters*, 127: 19-28.
- CRUZ, L.C.H. (1985) *Práticas de Micologia*. Editora Universidade Rural - Rio de Janeiro. 98p.
- CRUZ, L.C.H. (1996) Micotoxinas são tão importantes. In: *Micotoxinas: Perspectiva Latinoamericana*. L.C.H. da Cruz (editor). Editora Universidade Rural - Rio de Janeiro, 1-12p.

- CRUZ, L.C.H. (1997) Citrinina - uma micotoxina produzida por *Penicillium citrinum* Thom: aspectos microbiológicos, bioquímicos e toxicológicos. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) - UFRRJ, Seropédica, 267p.
- CRUZ, L.C.H.; CAMPOS, S.G.; ROSA, C.A.R. (1992) Aplicação do Ágar-Coco como Meio Diferencial para o isolamento de Fungos Citrinogênicos. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro, Itaguaí*, 15 (1): 39-60.
- DALCERO, A.M.; MAGNOLI, C.; HALLACK, e; CHIACCHIERA, S.M.; PALACIOS, O.; ROSA, C.A.R. (2002). Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section Nigri in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, Netherlands 19 (11): 1065-1072.
- DAVIES, N.D. & DIENER, U.L. (1983) Biology of *A. flavus* and *A. parasiticus*: Some characteristics of toxigenic and nontoxigenic isolates of *A. flavus* e *A. parasiticus*. In: Aflatoxin and *A. flavus* in corn. URBAN L. DIENER (Editor-in-Chief) Southern Cooperative Series Bulletin 279, Department of Research Information, Alabama Agriculture! Experiment Station,, Auburn University. 1983. 112p.
- D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. (1997) Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69: 155-166.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. (1980) *Compendium of Soil fungi*, London: Academic Press.
- DRAGACCI, S. (1995). Techniques analytiques pour la recherche de l'ochratoxine. *Revue de microbiologie et d'hygiène Alimentaire*, 22: 35-41.
- ELLING, F.; MOLLER, T. (1973) Mycotoxic nephropathy in pigs. *Bull. Wld Hlth. Org.*, 49:411-418.
- ELLIS, W.O.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K.; RAMASWAMY, H. (1993) Effect of inoculum level on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. *Food microbiology*, 10: 525-535.
- FAGUNDES, M.H. (2003) *Sementes de cevada*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/cas/especiais/CEVADA-SEMENTE.pdf>>. Acesso em: nov. 2003.
- FRIIS, P.; HASSELAGER, E.; KROGH, P. (1969) Isolation of citrinin and oxalic acid from *Penicillium viridicatum* Westling and their nephrotoxicity in rats and pigs. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 77-B1: 559-560.
- GAREIS, M.; CEYNOWA, J. (1994) Influence of the fungicide Matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 198, 244-248 apud D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. (1997) Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology* 69: 155-166.

- GATTI, M.J.A.; ROSA, C.A.R.; MAGNOLI, C.; FRAGA, M.E.; DALCERO, A.M. (2003) Mycological aspects and identification of potential aflatoxins and ochratoxins producers in harvested Brazilian black pepper. *Food Additives and Contaminants*, 20 (12): 1120-1126.
- GIMENO, A. (1980) Improved method for thin layer chromatographic analysis of mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63(2): 182-186.
- GRIFFIN, D.H. (1994) *Fungal Physiology-chapter 9 Secondary (Special) Metabolism*. 2 Ed. WILEY-LISS. Publications. New York 458p.
- GROENE, E.M.; JAHN, A.; HORBACH, G.J.; FINK-GREMMELS, J. (1996) Mutagenicity and genotoxicity of the mycotoxin ochratoxin A. *Environ. Toxicology and Pharmacology*, 1: 21-26.
- HARTLEY, R.O.; NESBITT, B.F.; O'KELLY, J. (1963) Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *NATURE*, 197: 1056-1058.
- HEENAN, C.N.; SHAW, K-J.; PITT, J.I. (1998) Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *J. Food Mycol.*, 1 (2): 67-72.
- HERRY, M.P. & LEMETAYER, L. (1992) Aflatoxin B₁ contamination in oilseeds, dried fruits and spices. *Microbiol. Alim. & Nutrition*, 10: 261-266.
- HILL, R.A. & LACEY, J. (1983) Factors determining the microflora of stored barley grain. *Ann. Appl. Biol.*, 102: 467-483.
- HORWITZ, W. & ALBERT, R. (1991) Performance characteristics methods of analysis used for regulatory purpose. Part II Pesticide formulations. *Jour. Of AOAC International*, 74: 718-744.
- KLICH, M. & PITT, J.I. (1988) A Laboratory Guide to common *Aspergillus* species and their Teleomorphs. *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*, 1988, North Ryde, 116p
- KOEHLER, P.E.; HANLIN, R.T.; BERAHA, L. (1975) Production of aflatoxins B₁ e G₁ by *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* isolated from market pecans. *Appl. Microbiology*, 30: 581-583.
- KROGH, P. (1992) Role of ochratoxin in disease causation. *Fd Chem. Toxic.*, 30 (3): 213-224.
- KROGH, P.; ELLING, F. (1977) Mycotoxic nephropathy. *Vet. Sci. Communic.*, 1: 51-63.
- LEE, H. B. & MAGAN, N. (2000) Impact of environment and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in Maize grain. *Int. J. Food Microbiol.*, 61: 11-16.

- LEGARDA, T. M. & BURDASPAL, P. A. (1998) Ochratoxina A en cervezas elaboradas en España y en otros países europeos. *Alimentaria*, abril: 115-122.
- LILLARD, H.S.; HANLIN, R.T.; LILLARD, D.A. (1970) Aflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* from pecans. *Appl. Microbiology*, 19: 128-130.
- LIN, M.T.; DIANESE, J.C. (1976) A coconut - agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, 66 (12): 1466-1469.
- LÓPEZ, C.E.; RAMOS, L.L.; RAMADÁN, S.S.; BULACIO, L.C. (2003) Presence of aflatoxin M₁ in milk for human consumption in Argentina. *Food Control*, 14: 3134.
- LOPEZ-DIAZ, T.M.; FLANNIGAN, B. (1997) Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. *Int. J. Food Microbiol*, 35:129-136.
- MANTLE, P.M. & CHOW, A.M. (2000) Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. *Int. J. Food Microbiol*, 56: 105-109.
- MARTINS, M.L. & MARTINS, H.M. (2002) Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. *Food Chemistry*, 79: 315-318.
- MINELLA, F. (1999) Cevada brasileira: situação & perspectivas. *Comunicado Técnico on line*, Embrapa Trigo, nº 23, dez. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/puboltri.htm>>.
- MIRAGLIA, M.; BRERA, C.; CORNELI, S.; CAVA, E.; MONTAMJNO, G.; MIRAGLIA, E. (1998) Occurrence of ochratoxin A. (AO) in maternal Serum, Placenta and folliculum. In: *Mycotoxins and Phycotoxins - Development in chemistry, Toxicology and food safety. Proceedings of International IUPAC symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, 9 - Miraglia, M; van Egmond, H.P; Brera, C. & Gilbert, 1 (Eds). Pages 165-179 - Alaken, Inc. Fort Collins, Colorado, 1998.
- MONTANI, M.L.; VAAMONDE, G.; RESNTR, S.L.; BUERA, P. (1988) Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn. *Int. J. Food Microbiol*, 6: 349-353.
- MOORE-LANDECKER, E. (1972) *Fundamentals of the Fungi*. Prentice-Hall, Inc., London-USA. 482p.
- MOSS, M. O. (1996) Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 13, Supplement: 5-9.
- MOSS, M. O. (1998) Recent studies of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 84: 62S-76S.

- MOSS, M.O. (2002) Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50: 137-142.
- NESBITT, B.; O'KELLY, J.; SEARGENT, K.; SHERIDAN, A. (1962) Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *NATURE*, 195: 1062-1063
- NOOTS, I.; DELCOUR, J.A.; MICHIELS, C.W. (1998) From Field Barley to Malt: Detection and Specification of Microbial Activity for Quality Aspects. *Critical Reviews in Microbiology*, 25 (2): 121-153.
- OLSSON, J.; BÖRJESSON, T.; LUNDSTEDT, T.; SCHNÜRER, J. (2002) Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *Int. J. Food Microbiol.*, 72: 203-214.
- PITT, J.I. (1994) The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32 supplement 1: 17-32.
- PITT, J.I. & HOCKING, A.D. (1985) *Fungi and Food Spoilage*, first edition, Academic Press, Sidney.
- PITT, J.I. & HOCKING, A.D. (1997) *Fungi and Food Spoilage*, second edition. Black Academic & Professional - Chapman & Hall. London. 593p.
- PITT, J.I. & MICAMBLE, B. F (1995). Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Jour. Food Protection.*, 58: 86-90.
- RABIE, C.J.; LÜBBEN, A.; MARAIS, G.J.; JANSEN VAN VUTJREN, H. (1997) Enumeration of fungi in barley. *Int. J. Food Microbiol.*, 35: 117-127.
- RAMOS, A.J.; LABERNIA, N.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N. (1998) Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on barley extract medium and barley grains. *Int. J. Food Microbiol.*, 44:133-140.
- ROSA, C.A.R.; CRUZ, L.C.H.; CHAGAS, W.A.; VEIGA, C.E.M.O. (1985) Ocorrência natural de Nefropatia Micotóxica Suína causada pela ingestão de cevada contaminada por citrinina. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 7(3): 87-90.
- ROSA, C.A.R. (2002) Micobiota toxígena e ocratoxinas em rações destinadas à alimentação de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - UFRRJ, Seropédica, 147p.
- ROSA, C.A.R.; PALACIOS, V.; COMBINA, M.; FRAGA, M.E.; REKSON, A.O.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M. (2002) Potencial ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 19 (4): 408-414.
- SABINO, M.; CORRÊA, M.J.S. (1981) Aflatoxina B₁ em feijão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2): 83-87.

- SAMSON, R.A. (2000) List of names of *Trichocomaceae* published between 1992 and 1999. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. R.A. Sanson & J.I. Pitt (Eds.) *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam, pp. 73-81.
- SCOTT, P.M. (1994) *Penicillium* and *Aspergillus* toxins. In: MILLER, D. & TRENHOLN (Eds). *Mycotoxin in grain compounds other aflatoxin*. Egan Press; St. Paul Minnesota, 261-285.
- SCUSSEL, V. M. (1998) *Micotoxinas em Alimentos*. Florianópolis: Insular, 144p. il.
- SMITH, J.E. & MOSS, M.O. (1985). *Mycotoxins - Formation, Analysis and Significance*. John Wiley & Sons: Great Britain, 148p.
- SOARES, L.M.V. & RODRIGUES-AMAYA, D. (1989) Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some Brazilian Foods by using Multi-toxin Thin-Layer Chromatographic Method. *J. Assoc. Off. Anal. Qhem.*, 72 (1): 22-26.
- SOARES, L.M.V. (s.d.) *Como obter resultados confiáveis em cromatografia*. Boletim Técnico nº 19. Disponível em: <micotoxinas.com.br/boletim19.htm>. Acesso em: 21 ago. 2003.
- SWEENEY, M.J. & DOBSON, A.D.W. (1998) Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol*, 43: 141-158.
- UENO, Y; MAKI, S.; LIN, J.; FURUYA, M.; SUGIURA, Y.; KAWAMURA, O. (1998) A 4-year study of plasma ochratoxin a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. *Food. Chem. Toxicol.*, 36 (5): 445-449.
- VAAMONDE, G.; PATRIARCA, A.; PINTO, V.F.; COMERIO, R.; DEGROSSI, C. (2003) Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. *Int. J. Food Microbiol*, 2738: 1-6.
- VAN CAMPENHOUT, L.; SHEN, H.Y.; ISERENTANT, D.; VERACHTERT, H. (1999) The gas environment of germinating barley in various microbial states during malting. *Process Biochemistry*, 34: 929-937.
- VELLUTI, A.; MARÍN, S.; BETTUCCI, L.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. (2000) The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B₁ and zearalenone formation. *Int. J. Food Microbiol.*, 59: 59-66.
- WEARING, A.H. & BURGESS, L.W. (1979) Water potential and the saprophytic growth of *Fusarium roseum* "Graminearum". *Soil Biol. Biochem.*, 11: 661-667.
- WHITAKER, T.B. (2003) Standardization of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. *Food Control*, 14: 233-237.

- WOOD, G.E. (1992) Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *J. Anim. Science.*, 70: 3941-3949.
- WOOD, G.E. & POHLAND, A.E. (1992) Mycotoxins in food and their safety ramifications. In: Food Safety Assessment - American Chemical Society, Washington, D.C. pp 262-275.
- ZIMMERLI, B. & DICK, R. (1995) Ochratoxin A in serum of residents north of Alps. *Jour. of Chromatography*, B 666, 85-89.

7 - APÊNDICE

Composição dos meios de cultivo utilizados no isolamento dos fungos e verificação do perfil toxígeno; meios e reagentes usados na caracterização nutricional das cepas de referência.

- Ágar coco (CAM)

Leite de coco (Sococo) 200 mL

Agar-agar 12 g

Água destilada 600 mL

Autoclavar a 121 °C por 15 mm.

Ajustar o pH em 6,9 (GATTI, 1997).

- Ágar Extrato de Malte (MEA)

Extrato de malte 20 g

Peptona bacteriológica 1 g

Glicose 20 g

Agar-agar 20 g

Água destilada 1000 mL

Esterilizar por autoclavação a 121 °C por 15 min. (PITT & HOCKING, 1997).

- Meio com amido

Amido solúvel 2 g

Peptona 10 g

Agar-agar 30 g

Água destilada 1000 mL

Fundir e Autoclavar a 121 °C por 15 mm.

Para cada fungo utilizar uma placa com meio sólido e 3 tubos com meio líquido (sem agar-agar).

- Meio Omelianski

Sulfato de amônio 1 g

Fosfato di-potássio 1 g

Sulfato de magnésio 0,5 g

Cloreto de sódio traços

Carbonato de cálcio 2 g

Água destilada 1000 mL

A solução pronta é armazenada sob refrigeração. É um meio isento de fontes de carbono, que será suplementado por tira de papel de filtro, previamente esterilizado.

REAGENTES

- Solução de lugol

Iodo metálico 1 g
KI 2g
Água destilada 300 mL

- Azul de Bromotimol

Azul de Bromotimol 1,6 g
Álcool a 96° 100 mL

- Reagente de Fehling

Sol. A: dissolver 34,65 g de sulfato de cobre em água destilada e completar para 500 mL.
Sol. B: dissolver 173 g de tartarato de potássio e sódio (sal de Rochelle ou sal Seignette) e 125 g de KOH em água destilada e completar para 500 mL.