

RAFAEL GOMES ABREU BACELAR

METABÓLITOS FÚNGICOS EM RAÇÕES PARA EQUINOS ADULTOS

TERESINA, 2017

RAFAEL GOMES ABREU BACELAR

METABÓLITOS FÚNGICOS EM RAÇÕES PARA EQUINOS ADULTOS

Dissertação apresentada à
Coordenação do Curso de Mestrado
em Ciência Animal da Universidade
Federal do Piauí como requisito para
a obtenção do Grau de Mestre em
Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade e
Reprodução Animal.

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

TERESINA, 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias

Serviço de Processamento Técnico

B116 Bacelar, Rafael Gomes AbreuMetabólitos fúngicos em rações para equinos adultos / Rafael
Gomes Abreu Bacelar - 2017.

57 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade
Federal do Piauí, Teresina, 2017.Orientação: Prof^a.Dr^a. Maria Christina Sanches Muratori1. *Aspergillus* 2. Espectrofometria de massa 3. *Fusarium* 4.*Penicillium* I. Título**CDD 589. 23**

METABÓLICOS FÚNGICOS EM RAÇÕES PARA EQUINOS ADULTOS

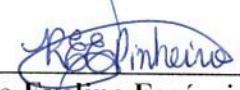
RAFAEL GOMES ABREU BACELAR

Dissertação Aprovada em: 27/01/2017

Banca Examinadora:



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



Profa. Dra. Raizza Eveline Escórcio Pinheiro (Interna) / CPCE/UFPI



Prof. Dr. Rodrigo Maciel Calvet (Externo) / IFMA

DEDICO

À Deus, pelo belo dom da vida e por tudo e tudo a ela atribuída.

Aos meus pais pela sabedoria de vida refletida a cada dia e por cada gesto de apoio nos diversos momentos de minha vida.

Às minhas irmãs pela solidariedade e intensa convivência.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Maria Christina Sanches Muratori por ser minha mentora em cada projeto e pela grande amizade.

À todos os meus colegas de laboratório, em especial: Camila Coutinho, Aline Martins, José Humberto, Aline Monte, Aline Dourado, Cristiane Evangelista, Juliana Abreu, Juliana Alexandre, João Farias e Juliet Teixeira pela convivência harmoniosa e pela cumplicidade.

Ao Márcio Rocha pela imensa contribuição e disponibilidade.

Aos colegas de mestrado Marcio Leonardo e Dérick Gustavo.

E a todos os que integram o Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos na UFPI, em especial ao George Emanuel, e todos os funcionários e estudantes de graduação, mestrado, doutorado e professores.

“Mais do que máquinas precisamos de humanidade.

Mais do que inteligência precisamos de afeição e doçura.

Sem essas virtudes a vida será de violência e tudo estará perdido.”

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	Vii
LISTA DE FIGURAS	Viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	11
2. CAPÍTULO I (Revisão de Literatura)	14
3. CAPÍTULO II	23
4. INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO II	24
5. METODOLOGIA	26
5.1 Coleta das amostras	26
5.2 Análises da atividade de água	27
5.3 Preparo das amostras para as análises micológicas	28
5.4 Quantificação de fungos	28
5.5 Isolamento e identificação de <i>Aspergillus</i> spp	28
5.6 Isolamento e identificação de <i>Penicillium</i> spp	29
5.7 Isolamento e identificação de <i>Fusarium</i> spp	29
5.8 Cromatografia de Camada Fina (Thin Layer Chromatography-TLC)	29
5.9 Determinação de Aflatoxinas e outros compostos químicos	30
5.10 Extração e purificação dos extratos	30
5.11 Preparo da curva de calibração das aflatoxinas	31
5.12 Condições cromatográficas	31
5.13 Análise estatística	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÕES	47
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Permitted limits for mycotoxins in various species.....	17
Tabela 2. Toxic effects of mycotoxins in different animals.....	18
Tabela 3. Principais metabólitos produzidos por fungos em vegetais.....	25
Tabela 4. Contagens de fungos filamentosos e leveduras (UFC/g em \log_{10}^{x+1}) em amostras de rações peletizadas para equinos, coletadas em propriedades rurais, com análises em tempo zero e após 3 e 6 dias de armazenamento, nas formas controle e em propriedades rurais de Teresina, PI.....	34
Tabela 5. Média e desvio padrão dos resultados de atividade de água nas amostras de rações peletizadas para equinos, coletadas em propriedades rurais, durante seis dias de armazenamento no laboratório e na propriedade pesquisada, em Teresina, PI.....	35
Tabela 6. Ocorrência (%) de fungos filamentosos isolados das amostras de rações peletizadas para equinos, coletadas em propriedades rurais, durante seis dias de armazenamento no laboratório e na propriedade pesquisada, em Teresina, PI	37
Tabela 7. Espécies do gênero <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp., isoladas em amostras de rações peletizadas para equinos, coletadas em propriedades rurais, com análises em tempo zero e após 3 e 6 dias de armazenamento, nas formas controle e em propriedades rurais de Teresina, PI.....	38
Tabela 8. Espécies do gênero <i>Aspergillus</i> com capacidade produtora de aflatoxina isoladas nas amostras de rações peletizadas para equinos, coletadas em propriedades rurais em Teresina, PI.....	40
Tabela 9. Níveis detectados de aflatoxinas ($\mu\text{g/Kg}$) em amostras de ração peletizada para equinos adultos coletadas em propriedades rurais em Teresina, PI.....	41
Tabela 10. Determinação de metabólitos fúngicos por cromatografia de massa das amostras de ração peletizada para equinos.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Chemical structures of some of the major mycotoxins produced by <i>Fusarium</i> spp.....	19
Figura 2. Cromatograma do padrão das Aflatoxinas G2,G1,B2,B1.....	32
Figura 3. Curvas de calibração para determinação e quantificação das aflatoxinas.....	33
Figura 4. Chuva acumulada mensal e chuva normal climatológica de Teresina durante 2016, com destaque para o período de amostragem.....	36
Figura 5. Estruturas químicas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.....	42
Figura 6. Cromatograma de uma amostra com as aflatoxinas AFB1e FG2.....	43
Figura 7. Fórmulas científicas dos compostos químicos encontrados na ração.....	46

METABÓLITOS FÚNGICOS EM RAÇÕES PARA EQUINOS ADULTOS

RESUMO

As micotoxinas são produtos resultantes do metabolismo de fungos normalmente presentes no ambiente em que se desenvolvem, como por exemplo: nos grãos, cereais e rações. Objetivou-se neste trabalho isolar e identificar a microbiota fúngica, classificar as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, avaliar o potencial toxigênico dos isolados de *Aspergillus* e pesquisar a ocorrência de metabólitos fúngicos em rações peletizadas para equinos adultos durante estocagem. As amostras de ração peletizada para equinos adultos foram colhidas de três propriedades criadoras de equinos, sorteadas de forma aleatória na cidade de Teresina, PI. Em cada propriedade selecionada, as amostras foram coletadas de sacos de ração abertos no momento da primeira coleta (tempo zero), armazenadas nos criatórios, com novas coletas sendo feitas deste mesmo saco a cada dois dias (tempo três e tempo seis) com três repetições no total. Foram isolados fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, realizada cromatografia de camada fina nas cepas do gênero *Aspergillus* potencialmente produtoras de Aflatoxinas. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/g) de fungos filamentosos e leveduras das amostras, porém, os valores se encontraram acima do recomendado. Foram isoladas espécies de *Aspergillus spp.* (*A. japonicus*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. ostianus*), *Penicillium spp.* (*P. citrinum*, *P. funiculosum* e *P. decumbens*) e *Fusarium spp.* (*Fusarium verticillioides* e *Fusarium semitectum*) com potencial micotoxigênico. Verificou-se que as cepas de *Aspergillus flavus* apresentaram potencial produção de Aflatoxinas. Foram evidenciados os seguintes metabólitos fúngicos: ergometrina, griseofulvina, festuclavina, ergina e lisergol. Os metabólitos encontrados quando consumidos em longo prazo podem conferir alterações reprodutivas e metabólicas nos equídeos, causando problemas relativos à sanidade e produção destes animais.

Palavras-chave: *Aspergillus*, Espectrofotometria de massa, *Fusarium*, *Penicillium*.

METABOLITE OF FUNGUS IN FEEDS FOR ADULT EQUINE

ABSTRACT

Mycotoxins are products resulting from the metabolism of fungi usually present in the environment in which they develop, such as in grains, grains and feeds. The objective of this work was to isolate and identify the fungal microbiota, to classify the species *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, to evaluate the toxigenic potential of *Aspergillus* isolates and to investigate the occurrence of fungal metabolites in pelleted rations for adult horses during storage. The samples of pelleted ration for adult horses were collected from three equine breeding properties, randomly drawn in the city of Teresina, PI. In each selected property, the samples were collected from feed bags opened at the time of the first collection (time zero), stored in the nurseries, with new collections being made from this same bag every two days (time three and time six) with three replicates In total. Fungi of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* genotypes were isolated, and thin - layer chromatography was performed on *Aspergillus* strains potentially aflatoxin - producing. There was no significant difference ($p < 0.05$) for counting of colony forming units (CFU / g) of filamentous fungi and yeasts of the samples, however, the values were above the recommended values. Species of *Aspergillus* spp. (*A. japonicus*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. ostianus*), *Penicillium* spp (*P. citrinum*, *P. funiculosum* and *P. decumbens*) and *Fusarium* spp. (*Fusarium verticillioides* and *Fusarium semitectum*) with mycotoxigenic potential. It was verified that the strains of *Aspergillus flavus* showed potential production of Aflatoxins. The following fungal metabolites were evidenced: ergometrine, griseofulvin, festuclavin, ergine and lysergol. Metabolites found when consumed in the long term can confer reproductive and metabolic changes in equines, causing problems related to the health and production of these animals.

Keywords: *Aspergillus*, Mass spectrophotometry, *Fusarium*, *Penicillium*.

1. INTRODUÇÃO

A safra brasileira de grãos alcançou 209,5 milhões de toneladas em 2014/2015, atingindo uma produção superior à dos anos anteriores. O aumento foi de 15,9 milhões de toneladas (aproximadamente 8,2%,) sobre da produção de 2013/2014, que foi 193,62 milhões de toneladas (CONAB, 2015).

Estes resultados favorecem a produção de rações que são formuladas à base de grãos e cereais integrais. O balanceamento adequado dos alimentos e rações disponibilizados para animais depende da qualidade da matéria-prima utilizada. Esses ingredientes devem possuir composição química e energia metabolizável para que os alimentos sejam formulados conforme as exigências nutricionais dos animais (JUNQUEIRA, 2009).

Em grande parte dos países, os padrões de qualidade da matéria-prima, incluindo a cor, grãos quebrados, material estranho, teor de água, peso hectolítrico, presença de fungos e presença de micotoxinas, esses parâmetros definem a qualidade dos grãos para transações comerciais (BENTO, 2011).

Os principais fungos responsáveis pela deterioração dos grãos na pré-colheita e também durante o armazenamento pertencem aos gêneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* e *Stachybotrys*. Dentre eles destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* por serem considerados de maior importância na contaminação dos alimentos e da ração e por serem os maiores produtores de micotoxinas. Dentre os principais danos causados em grãos armazenados em função do desenvolvimento de fungos, destaca-se: a fermentação, alterações na coloração e aparecimento de manchas, alterações no odor e no sabor, alterações químicas, perdas de matéria seca, diminuição do poder germinativo e produção de micotoxinas (CALVET, 2008; CARDOSO; MURATORI, 2011; FERRARI FILHO, 2011).

As micotoxinas são produtos resultantes do metabolismo secundário de fungos, e são normalmente encontrados no substrato em que os fungos se desenvolvem, como por exemplo: nos grãos, cereais e rações. Fatores ambientais, como temperatura ambiente e umidade elevada do substrato, associados ao processamento, produção ou armazenamento, além do tipo de alimento são essenciais para produção de micotoxinas (FERREIRA, 2012).

Outros fatores como: a constituição do substrato, características genética do fungo, lesões à integridade dos grãos causados por insetos ou dano mecânico e a

quantidade de inóculo fúngico também são determinantes para a produção de micotoxinas. As condições de secagem e armazenagem são elementos críticos importantes para o desenvolvimento de fungos e desses metabólitos durante a produção de alimentos (SILVA et al., 2008).

As mudanças climáticas propiciam o desenvolvimento fúngico e conseqüentemente a produção de micotoxinas, que ao serem ingeridas podem afetar a saúde humana e animal. O estudo da contaminação de cereais que constituem a base da dieta é de extrema importância, pois além de ser uma ferramenta de vigilância sanitária, fornecerá dados relacionados à presença das micotoxinas que estão presentes nos alimentos e rações (FAO/WHO, 2011).

A ingestão constante de rações que contenham micotoxinas, mesmo em baixos teores e baixa frequência, por tempo prolongado pode favorecer bioacumulação nos tecidos. Estes metabólitos também têm efeitos nefrotóxicos, carcinogênicos, teratogênicos que podem favorecer a redução do desempenho produtivo e reprodutivo dos animais (MAIA; SAKATA; SABBAG, 2011). Deste modo, objetivou-se neste trabalho isolar a microbiota fúngica, identificar as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, avaliar o potencial toxigênico dos isolados de *Aspergillus* e pesquisar a ocorrência de metabólitos fúngicos em rações peletizadas para equinos adultos durante estocagem.

2. CAPÍTULO I (REVISÃO DE LITERATURA)

***Fusarium* spp. e FUMONISINAS EM RAÇÕES PARA EQUINOS E A IMPORTÂNCIA PARA OCORRÊNCIA DE LEUCOENCELOMALÁCIA**

***Fusarium* spp. AND FUMONISIN IN FEED FOR EQUINE AND THE IMPORTANCE FOR LEUCOENCELOMALÁCIA OCCURRENCE**

Artigo enviado e publicado na revista African Journal of Microbiology Research, v. 10(32), p. 1248-1256, 2016 (Nº73F3E9E60263)

DOI: 10.5897/AJMR2016.8204 (anexo 1)

Review

***Fusarium* spp. and fumonisin in feed for equine and its importance for occurrence of leukoencephalomalacia**

Rafael Gomes Abreu Bacelar*, Francisco das Chagas Cardoso Filho, Juliana de Abreu Costa, Amilton Paulo Raposo Costa, Maria Marlúcia Gomes Pereira Nóbrega and Maria Christina Sanches Muratori

Universidade Federal do Piauí (UFPI), Brasil.

Received 10 July, 2016; Accepted 3 August, 2016

In the animal feed industry, an ever growing increase in quality has been observed, but the main feature of a food is related to its security because the contamination poses a risk to animal health. The problems caused by fungal colonization is the significant loss of food quality, because even those who do not produce mycotoxins cause losses in the nutritional quality. Researches show that the most important Fumonisin are the mycotoxins found in corn, particularly when cultivated in warmer regions, produced by the fungi *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. Equine leukoencephalomalacia is a disease caused by ingestion of mycotoxin produced by the fungus *F. verticillioides*. Those infective mycotoxins are fumonisin (B1, B2, A1 and A2), having the B1 type as the most common and the most severe. The animals contamination occurs by ingestion of corn and its by-products in food that are contaminated by the fungus. This review addresses the importance of fungal contamination of the genus *Fusarium* by the production of fumonisin in horse feed and its relation to leukoencephalomalacia.

Key words: Fungi, mycotoxins, corn, food.

INTRODUCTION

Horses are animals that have been historically used by humans, mainly as a means of transport and also as an instrument of war. Over the years, horses developed skills ranging from physiological and physical features, until achieving the current conformation presented nowadays (Santos et al., 2012).

The human's relationship with horses is reported since the beginning of domestication, involving various functions like riding cavalry, some work activities and

also used for leisure (Vieira, 2012).

With the development of management, sought to increasingly attend the nutritional needs and the welfare of these animals, deploying horse breeding, which has conquered several other areas of horse action, which involves leisure activities, sports and therapy with these animals (Santos et al., 2012).

In Brazil, the horse breeding has been outstanding and has been developing research and practices in nutrition

of these animals, which has been serving the needs and optimizing the functioning of the competitive market of sport horses in the country (SÁ, 2014). In Brazil its main functions still remain in the work of agricultural activities, which basically involve the management of cattle (MAPA, 2014).

The world population of horses is estimated in 59.8 million of heads, which is a stable number since 2010 (FAO, 2013). In Brazil, much of the herd is in the Southeast, then immediately appear the Northeast, Midwest, South and North. It can highlight the Northeast, because of having the largest concentration of horses, and more registration of asses and mules (MAPA, 2014). Horses are animals with nutritional requirements that are basically determined by the maintenance of power-up and also for its energy that is used to perform physical activities, thereby determining the feeding of those animals must be balanced and must be a composition proper proportions of nutrients, which determine maintenance of your body condition. The amount of food that a horse can eat in your daily diet will depend on certain requirements, among them, the dry matter content of food relative to their body weight, their performance, and also relating to their physiological state and level of physical activity performed (Ribeiro et al., 2009).

Regarding its food habits and physiology, horses are classified as monogastric animals, vegetable grazing, and have the characteristic of food selection capability where they choose more often the leaves, stems and buds. They spend in grazing about 10 to 16 h a day, their meals are on average 2 to 3 h and in some cases have short rest intervals (Dittrich et al., 2010).

In the animal feed industry seeing an increasingly growing increase in quality, and it relates to various parameters relating to the constitution of food, the balance, palatability, digestibility and acceptability of such products for animals. However, the main feature of a food is linked to its security because the contamination poses a risk to animal health (Góes, 2011).

Equine leukoencephalomalacia (ELEM), also known as equine mycotoxic encephalomalacia or corn poisoning is a devastating neurologic diseases of equidae characterized by acute central neurological clinical signs associated with liquefactive necrosis of the cerebral sub-cortical white matter. The disease has been reported in several countries and it is caused by ingestion of one or more type of fumonisins (Kellerman et al. 1990), mycotoxins produced by several species of fungi of the genus *Fusarium*, including *F. proliferatum* and *F. verticillioides* (formerly *F. moniliforme*). Of these, fumonisins B1 (FB1), B2 (FB2) and B3 (FB3) are the most common in nature and FB1 is the most frequently detected in corn worldwide and the most commonly associated with ELEM outbreaks. Fumonisins are responsible for a variety of health problems in several animal species, including humans (Shephard et al., 1996; FDA 2001).

REVIEW

Fungi in animal feed

Fungi are characterized by being microorganisms that have wide distribution in the environment, with high geographic dispersion. They are important in several economic activities such as production of food, drugs, enzymes and organic acids. Other aspect of these organisms is that some fungi are pathogenic to plants and food spoilage, which may cause reduction in the nutritional value of food, the production of secondary metabolites and diseases in humans and animals (Silva et al., 2015).

The fungi naturally disperse through the atmospheric air. This is the way most used by fungi, by their spores and vegetative mycelium fragments that are released into viable portions of these organisms for air dissemination process. The fungal conidia are very important in this spreading segment, as the biological material suspended in the air often becomes imperceptible in an epidemiological analysis (Lobato, 2014).

The process of plant infection with the fungus is caused by the pathogen contact with the host root, so the plants can germinate resistance structures, stimulated by exudates produced by the plant and this determines a prominent infection. The penetration process occurs through the primary root or rhizoid and also absorbent structures. The infection process by the fungus, descriptively is performed through wounds or natural openings in the cell wall of roots, the effectiveness of this infection and subsequent development in the host includes the production of enzymes, toxins and virulence factors (Gawehns et al., 2014).

The colonization occurs with the intercellular growth hyphal toward the xylem vessels. As a result, the development of the fungus will lead to the obstruction of vessels due to the accumulation of structures and substances formed by the pathogen. In this intrinsic process, some mycotoxins can be produced by the fungus, and can naturally also block the vessels, and its damaging effects can destroy surrounding cells, causing accumulated material reaching the leaves. It also reduces the synthesis of chlorophyll, decreased movement of water and nutrients rate, which results in further decrease in cellular respiration as a result harmful effects on the production of the fruit (Takken and Rep, 2010).

It occurs a blackening of the vessels caused by substances that result from oxidation and polymerization of phenolic compounds. The symptoms spread throughout the plant leaves and, depending on the aggressiveness of some isolated, they can quickly become necrotic (Ma et al., 2013).

After infection by pathogenic fungi, some forage grasses show biochemical changes that lead to a loss of nutritional quality, and consequently also the food palatability for animals due to the reduction in the

concentration of proteins, amino acids, sugars, soluble carbohydrates and digestibility of the dried matter, and increased phenolic compounds and lignin in the infected plants (Martinez et al., 2010).

The problem caused by fungi colonization is the significant loss of food quality, even those who do not produce mycotoxins can cause losses in nutritional quality for being heterotrophic and they are not able to produce their own food, needing of nutrients present in the substrate inhabited (Gimeno and Martins, 2011). Fungi that produce mycotoxins include in the grain and make use of the substrate as a source of energy and nutrients and require a minimum moisture content of the substrate between 13 and 25%; relative humidity of the air greater than 70%; the presence of oxygen and the presence of appropriate temperatures to make their development in infested crops (Alfonzo et al., 2011). The fermentation, coloration changes, staining, changes in the odor and flavor, chemical changes, loss of dry matter, decreased germination and production of mycotoxins are the major damages to stored grain because of the fungi development (Ferrari Filho, 2011).

Contamination of raw materials directly affects livestock productivity and contributes to the loss of crops, which causes economic losses to the food industry and costs for control and analysis of mycotoxins (Cheli et al., 2013). In the infections caused by fungi in animals, pathogens establish infection opportunistically invading host tissue as soon as it invades the immune system, making survival mechanisms, then they can reproduce in this environment. To survive fungi go to nourish in infected tissues, and in cases of systemic infection, they spread to new tissues or organs (Negri et al., 2012).

Fusarium

The *Fusarium* is cosmopolitan fungi, which are largely inhabitants of the soil and is found in more favorable conditions in temperate and tropical regions. Many species are pathogens of cultivated plants, especially those that are important in the agricultural sector (Leslie; Summerell, 2006).

The genus *Fusarium* belongs to Nectriaceae family, Ascomycota phylum, and this fungal genus was described and classified for the first time in 1809 by the German mycologist Link (Maciel, 2012). Among the duties of the genus *Fusarium*, one is having wide geographical distribution, and its dispersion and development factor in the environment may be associated with the types of the climate, the vegetation, the microbiota, the type of soil and nutrients. It is also distinguished by having rapid growth, colonies with pale and colorful colorings and aerial and branched mycelium (Maciel, 2012; Frias, 2014).

Approximately about 1000 *Fusarium* species were described in 1900, based primarily on structure tests,

including sporodochia in plant materials analyzed. These large number of species have been reduced by Wollenweber and Reinking (1935) in 65 species, 55 varieties, 22 forms, and arranged in 16 sections (Leslie et al., 2013).

The importance of this fungus is evidenced by most of these species are plant pathogens and widely inhabit the soil (Guarro, 2013).

In this genus the spores have two forms that are called microconidia and macroconidia. Microconidia are unicellular, uninucleate and fusiform. The macroconidia are multicellular, but each cell has only one core (Sandoval, 2010).

Pathologies triggered in cultures by the *Fusarium* species has as a imminent result the rotting of the roots, stems and fruits (Menezes et al., 2010). In corn culture, *F. verticillioides* and *F. graminearum* are the main pathogenic species of *Fusarium* that can cause various diseases associated with drastic reductions in productivity result in grain quality (Kuhnem Júnior et al., 2013).

In general aspects, the genus *Fusarium* is identified as a fungus that can be potentially pathogenic to plants, animals and humans and can also be a producer of secondary metabolites which cause poisoning by ingestion of food contaminated by humans and other animals (Leslie et al., 2013).

Mycotoxins

Mycotoxins are products that result from fungal metabolism. That is, they are secondary metabolites that can affect both human and animal health. Typically, mycotoxins are present in the environment in which they develop, such as grain-based food, cereals and feed. The environmental factors that contribute to the occurrence of mycotoxins are mainly ambient temperature, high humidity of the substrate associated with the processing, production or storage, and food type (Ferreira, 2012). Mycotoxins cause pathological and functional changes in the animal body, which are called mycotoxicosis. One of the main damage caused by mycotoxins is its carcinogenic effect, which can affect animals and humans (Pereira; Santos, 2011).

The presence of fungi in agricultural products does not mean that the fungus produced mycotoxins. However, the detection of mycotoxins can occur with no presence of the fungus in food, since mycotoxins are highly resistant to adverse conditions such as industrial processes involving mechanical and thermal phases. In this way, the mycotoxins may remain in food even after the elimination of the fungus that produces them (Oliveira and Koller, 2011).

Mycotoxins can cause various harmful biological effects in the animal organism, including, hyperestrogenism, nephrotoxicity and hepatotoxicity (Rocha et al., 2014). The establishment of strict limitation and tolerance levels

Table 1. Permitted limits for mycotoxins in various species.

Mycotoxin	Feed stuff(s)	Limit (ppb)	Country / Authority
Aflatoxin B1	Maize	5	Turkey, Russia, Egypt.
	Maize	10	China, Korea, Japan
	Animal feed	10	Egypt
	Animal feed	50	Turkey
	All cereals except rice and maize	2	EU
	Unprocessed maize and rice	5	EU
	Animal feed ingredients	20	EU
	Feed stuffs for immature animal	20	FDA
Aflatoxin B1& G1	Maize	30	Brazil
Aflatoxin M1	Milk	0.5	U.S.A, Russia, Egypt
		0.05	Turkey
Deoxynivalenol	Milk and milk products	0.05	EU
	Milk	0.5	FDA
	Unprocessed cereals other than wheat, oats and maize	1250	EU
	Unprocessed wheat and oats, maize	1750	EU
	Cereal products	500	EU
	Cereals and cereal products for feed	8000	EU
	Maize by-products for feed	12000	EU
	Animal feed	100	FDA
Fumonisin B1, B2	Animal feeds except Equines	50	EU
	Animal feeds for Equines	5	EU
Fumonisin B1, B2, B3	Animal feeds except Equines	30	FDA
	Animal feeds for Equines	5	FDA
Fumonisin	Unprocessed maize	2000	EU
	Maize products for human	1000	EU
Ochratoxin A	Unprocessed cereals	5	EU
	Cereals and cereal products for feed	250	EU
	Cereal products for food	3	EU
T-2 and HT-2	All cereals grains	100	EU
Total aflatoxin	Animal feed ingredients	50	EU
	Animal feed	20	Canada, Egypt, Iran
	Maize	50	Brazil
		10	Turkey, Egypt
	Cereals feedstuffs	30	India
		200	Mexico
		20	Japan, U.S.A, Korea
		4	EU
		10	EU
		100	FDA
Zearalenone	Unprocessed cereals other than maize	100	EU

EU: European Union. FDA: Food and Drug Administration. Source: Abdallah et al. (2015).

of mycotoxins is held by national and international authorities such as the European Commission (EC), US Food and Drug Administration (FDA) and World Health Organization (WHO) as shown in Table 1. FDA has established the maximum acceptable limits in food for sum of AFs (B1, B2, G1, and G2) at 20 µg/kg and AFM1 in milk at 0.5 µg/kg while the total Afs residue limit in

feeds for mature and immature animals is 100 and 20 µg/kg, respectively (Womack et al., 2014). Up to date, the major source of food and feed all over the world is cereal grains.

As a result of their health implications and increasing knowledge of health hazards, regulations for major mycotoxins in commodities exist in at least 100

Table 2. Toxic effects of mycotoxins in different animals.

Mycotoxin	IARC† classification	Major effects	Clinical and pathological signs on most susceptible animals
Aflatoxins Aflatoxin M1	1 2B	Carcinogenic, hepatotoxic and impaired immune system	Reduced productivity; inferior egg shell and carcass quality; increased susceptibility to infectious disease.
Ochratoxin A	2B	Carcinogenic, nephrotoxic, hepatotoxic, neurotoxic and teratogenic	Kidneys are grossly enlarged and pale due to nephrotoxicity; fatty livers in poultry; shell decalcification/thinning.
Deoxynivalenol	3	Immunotoxic and ATA (alimentary toxic leukopenia)	Decreased feed intake and weight gain in pigs; feed refusal and vomiting at very high concentrations.
Other trichothecenes (T-2 toxin)	3	Immuno-depressants, gastrointestinal haemorrhaging and hematotoxicity	Reduced feed intake; vomiting, skin, and gastrointestinal irritation; neurotoxicity; abnormal offspring; increased sensitivity to infection; bleeding.
Zearalenone	3	Fertility and reproduction (estrogenic activity) and disrupts endocrine system	Swollen, reddened vulva, vulvovaginitis, anestrus vaginal prolapse and sometimes rectal prolapse in pigs; feminization and suppression of libido; suckling piglets may show enlargement of vulvae; fertility problems.
Fumonisin	2B	Carcinogenic, hepatotoxic, central nervous system damage and immuno-depressants	Equine leucoencephalomalacia (ELEM), porcine pulmonary edema, liver damage in poultry.

†International Agency for Research on Cancer. 1: carcinogenic to humans AFs; 2A: probably carcinogenic to humans; 2B: possibly carcinogenic to humans; 3: not classifiable as to its carcinogenicity to humans; 4: probably not carcinogenic to humans. Source: Abdallah et al. (2015).

countries (Oruc et al., 2006; Cheli et al., 2014). Because of the health risks of toxicity, Brazilian law establishes maximum levels for AFB1 (5 µg kg⁻¹) and OTA (10 µg kg⁻¹) in cereals and cereal products; and ZEA e in wheat flour and bakery products (200 µg kg⁻¹ until December of 2015, and from January of 2016 this limit will be reduced to 100 µg kg⁻¹) (BRASIL, 2011).

The thresholds of toxicity of mycotoxins intake by equine species vary from animal to animal and depend on parameters such as their health status, level of work and the reproductive stage of this species. The mycotoxins sporadically occur in isolation and its effects are usually synergistic or cumulative. In the body of the equine species, the mycotoxins ingested in the feed are absorbed before occurs post-gastric fermentation. The metabolites reach the small intestine where they exert their effect on the intestinal wall. After, they are absorbed and distributed via the bloodstream (Knowmicotoxins, 2015).

The factors that provide or interfere with fungal growth and production of mycotoxins are physical,

chemical and biological. Physical factors are moisture or free water, water activity, relative humidity, temperature, microflora zones, and physical integrity of grain. Chemical factors are the pH, substrate composition, minerals and nutrients, redox potential (O₂ / CO₂). Biological factors are characterized by the presence of invertebrates and specific strains with production ability (Gimeno and Martins, 2011). The mechanism of action of mycotoxins in the host involves the impairment of the animal's immune status that favors various infections, which will depend on the type of mycotoxin involved (Table 2). These attributes are a major reason for the difficulty of diagnosis of mycotoxicosis (Iheshiulor et al., 2011).

Six classes of mycotoxins are considered the most significant in agriculture and in the food industry: aflatoxins (AFs), ochratoxins (OTs), fumonisin (FBs), zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and other trichothecenes, and Patulin (Figure 1). They are the most widespread mycotoxins in animal feed and human

food (European Food Safety Authority, EFSA, 2010).

Fumonisin

The fumonisins had its first statements about 1988. They are produced by the gender *Fusarium*. The main species that produce fumonisins are: *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. anthropilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. subglutinans*, *F. polyphialidicum* and *F. oxysporum* (Cruz, 2010; Mallmann et al., 2013).

There are several types of fumonisin due to the large amount of producing species. So far, it is known around 25 substances, which B1, B2 and B3 occur more frequently in food (Cruz, 2010; Pereira and Santos, 2011; Santana, 2012).

The climate in Brazil favors the contamination of grain by fungi. The conditions of high humidity and temperatures of about 20 to 26°C are optimal for the production of these metabolites (Cruz, 2010). In Brazil there is a high incidence of contamination

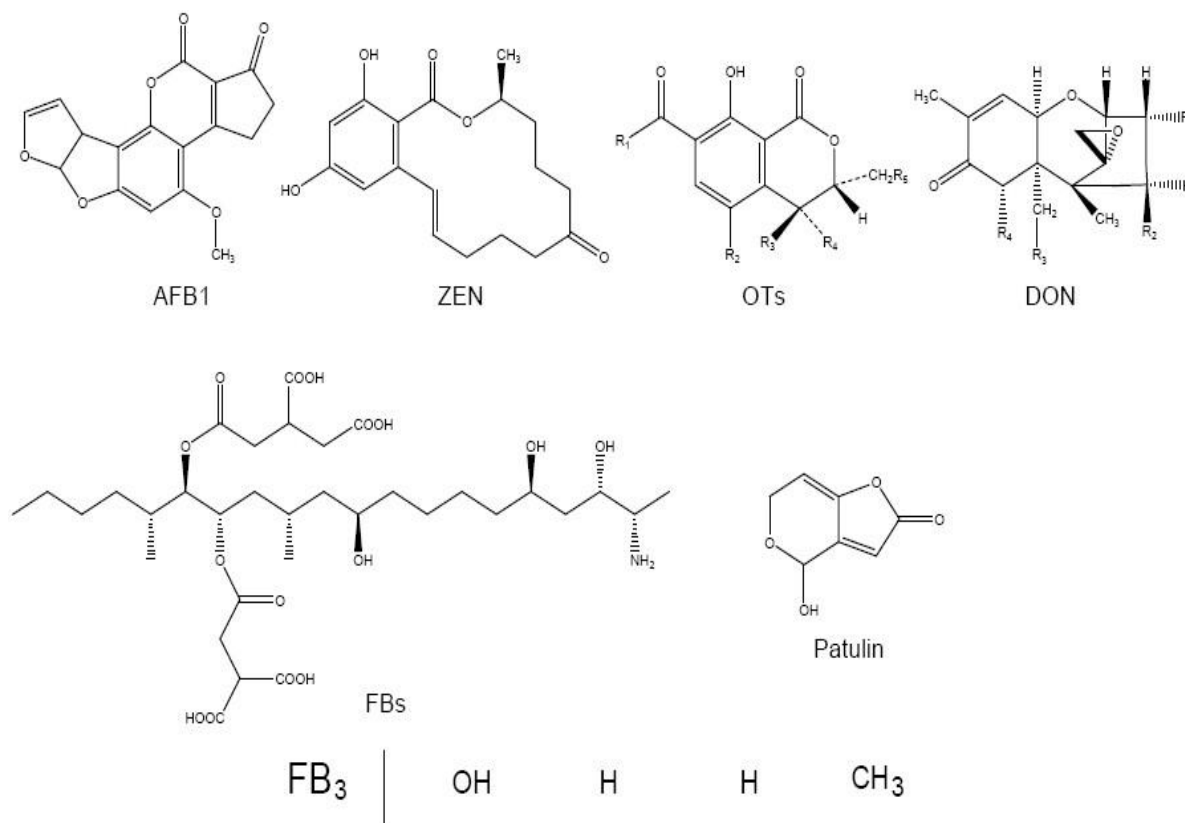


Figure 1. Chemical structures of some of the major mycotoxins produced by *Fusarium* spp.

by fumonisins in diets in general. The raw material of these feeds, especially corn and its derivatives, are naturally colonized by these fungi producing mycotoxins. This condition can lead to a high incidence of contamination in feed intended for animal consumption. (Souza et al., 2013; Cardoso Filho et al., 2015). This natural contaminant of cultures occurs worldwide and is of great importance for the economy and public health (Marin et al., 2013).

Studies report that diseases caused by fumonisin are quite frequent. The chronic use in animal of subclinical levels of toxin can degrade the function of the immune system (Grenier et al., 2011).

Fumonisin is highly toxic and is found not only in corn and its derivatives, but it can be found in many other types of foods such as beer, brewer's grains, wine, rice bran, sorghum, millet or folder. The metabolites may occur in low concentrations in a production. This metabolite often is linked to internal array of food, and it is not easily extracted due to its strong interaction, non-covalent, with macromolecules of food matrix (Scott, 2012).

The toxic mechanism of Fumonisin B1 in the animal organism is related to inhibition of biosynthesis of sphingolipid of cell membrane. Such inhibition can cause several cellular damages. Parallel pathways may be

affected by the inhibition of ceramide synthase, as well as the bioactivity of sphingoid bases and their metabolites, and the multiple functions of more complex sphingolipids (Merrill Jr. et al., 2001; Soriano et al., 2005).

This is because fumonisins have similar structures to the precursors of sphingolipids, which allows change of important cellular functions, such as control of membrane integrity, cell proliferation, differentiation and apoptosis (Rocha, 2014).

Acute and chronic effects of toxicity of FB1 include diseases such as esophageal cancer and neural tube defects in humans. It can cause carcinogenicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity and neurotoxicity in animals (Rocha et al., 2014).

Analytical methods for the determination of fumonisin are typically based on chromatography techniques (high-performance liquid chromatography) in combination with a variety of detection methods (molecular fluorescence or mass spectrometry) (Shephard et al., 2012).

Research has shown that the Fumonisin are the most important mycotoxins found on corn, especially when grown in warmer regions. The producing fungi, such as *F. verticillioides* and *Fusarium proliferatum*, can grow over a wide range of temperatures, but only with relatively high amounts of water. (Cao et al., 2013; Cardoso Filho et al., 2015).

Equine leukoencephalomalacia

Equine leukoencephalomalacia is a disease caused by ingestion of mycotoxin produced by the fungus *F. verticillioides*. The infective mycotoxins are fumonisins B1, B2 and B3. The mycotoxin B1 is more frequent and severe. Animal intoxication occurs by ingestion of corn and its sub-products contaminated by the fungus (Del Fava, 2010).

The use of corn and its derivatives in the feeding and supplementation of equine diet is needed during the shortage of pasture forage (Del Fava, 2010). In a retrospective study of equine diseases in Rio Grande do Sul-Brazil, leukoencephalomalacia was the nervous system disease most frequent (Pierezan, 2009).

Fumonisin (B1, B2, and B3), in the central nervous system equine, develop sudden neurological signs due to the liquefaction necrosis of the white matter. The animal's death may occur 4 to 72 h after the clinical course. However, depending on the amount of infective dose of mycotoxins, animal survival time can extend from one to two weeks (Méndez; Riet-Correa, 2007).

The use of corn-based supplementation in the diet of equine involves products such as natural corn, pollard, bran or corn xerém. Some regions make use of waste processing industries of this grain, particularly during the shortage of fodder in pastures, which favors the onset of disease (Ragsda and Debey, 2003).

Frequently detected in corn worldwide and the most commonly associated with leukoencephalomalacia outbreaks. Fumonisin are responsible for a variety of health problems in several animal species, including humans. These compounds are carcinogenic in laboratory rodents and the International Agency for Research on Cancer of the World Health Organization has included them in the list of probable carcinogenic substances for humans. Amongst the domestic animals, horses are the most sensitive to fumonisin intoxication, the toxic effects of FB1 in this species being dose-dependent. The clinical signs include decreased tongue tone and mobility, proprioceptive deficit, ataxia, anorexia, lethargy, blindness, circling, aimless walking, head-pressing, hyperexcitability, diaphoresis and coma. Affected animals that develop clinical signs but survive usually show some degree of neurologic deficit for life (Maxie; Youssef 2007; Pacin et al., 2009).

The pathogenesis is not yet completely understood. The enzyme sphingosine-N-acyltransferase is structurally inhibited by fumonisins. This enzyme is involved in sphingolipids biosynthesis and it is hypothesized that the accumulation of the enzyme substrates as well as the depletion of complex sphingolipids, may account for the toxicity of these. The characteristic gross lesion is restricted to the white matter of the cerebral hemispheres and consists of softening, cavitation and yellow discoloration. The lesion may be focal or multifocal, uni or bilateral and mild cases may not show gross lesions at all. Histologically, the most characteristic lesions consist

of areas of liquefactive necrosis, edema and hemorrhage affecting the encephalic white matter. A presumptive diagnosis is established based on clinical signs and on gross and/or histological findings. Confirmation of the diagnosis relies on detection of toxic concentrations of fumonisins in feed (Beasley, 1999; Maxie and Youssef, 2007).

In horses, the signs are characterized by brain injuries, brain stem injury. In mules, the predominant signs are generally characterized by lesions of the brain stem (Riet-Correa et al., 2007).

PREVENTIVE ACTIONS

The use of pasture rotation in non-host plants and the elimination of crop residues are ways that favor the decrease in pathogenic strains. The increase in microbial activity is decreased by effective practices that increase soil suppressiveness by the antagonist ability of these methods provide against potential pathogen (Zhao et al., 2013).

The use of integrated management in modern agriculture has contributed in order not only to increase production in less space, but also in significant improvement in the control of weeds, pests and diseases. The main advantages are increased productivity of crops, increased profitability, significant reduction in production costs, rational use of pesticides, reduced use of water and fuel, and less use of machines for cultivation which leads to lower release of greenhouse gases (Lerayer, 2010).

Advances in crop technologies have increased the productivity of maize. Examples of these new techniques are the direct planting, which uses correction and proper soil fertilization; extensive use of integrated management techniques of weeds, diseases and insect pests; and increased adoption of improved seeds with high production capacity. The most important contributions in the use of these new techniques are the use of simple hybrids and adoption of genetically modified seeds (Gravina; 2011).

Some *Fusarium* spp. tend to be less aggressive, which can be observed by analysis of visible symptoms in the host. Some of these strains can be represented by *F. verticillioides*, which nevertheless is an excellent pathogen in the production of mycotoxins. However, these pathogens should not be neglected since the resistance of a species cannot be extended to the others. That is, resistance to an isolated pure from one species can not result in cross-resistance to a *Fusarium* population in commercial corn fields (Reid et al., 2009). The conditions for fungal growth and therefore mycotoxin production depends on environmental factors and erroneous parameters, such as agricultural production without technical and preventive measures, inadequate drying, handling, packaging, storage, and transport conditions that may promote fungal growth (Marin et al., 2013).

In general, fungal infestations are difficult to be handled by conventional methods due to the ability of these pathogens to survive in different environments. Among these places, the soil and crop residues can be cited, which characterizes the persistence of these pathogens. An efficient and cost-effective control technique is the use of resistant cultivars. (Bakhsh et al., 2007).

The fungicides carbendazim, thiram + benomyl, and thiram + captan, are used for seed treatment (Nene et al., 2012). The systemic use of chemical fungicides on plants is considered costly because it may bring about damage to the environment. Another problem is that these fungicides cannot prevent infection and colonization of roots by the pathogen (Animisha et al., 2012).

The preventive measure against poisoning of equines is based on the recommendation of the use of corn and its sub-products in amounts lower than 20% of total of dry matter ingested by these equines. The corn used must be subjected to a correct drying process. However, the disease can occur in equines who eat corn dried previously with moisture within the standards required in Brazil, which is less than 15%. Thus, it is necessary to completely dry so that there is no possibility of fungal growth in the raw material (Méndez and Riet-Correa, 2007).

CONCLUSIONS

Thus, it can be noted that the equine feeding with the use of ration requires a lot of care. Such care may range from preparation of feed until the supply of the animals. The processes of production, storage and delivery when not held properly could favor the growth of fungi, such as those from the genus *Fusarium*. Fungi of this genus are producers of fumonisin, which can lead to leukoencephalomalacia outbreaks, among other pathologies. Therefore, it is emphasized the importance of control methods and awareness for the production of feed. These actions may help to minimize the contamination by fungi and reduce the risk of diseases to equines, what may lead to a better nutritional quality for the animals and less economic losses.

Conflict of Interests

The authors have not declared any conflict of interests.

REFERENCES

- Abdallah MF, Girgin G, Baydar T (2015) Occurrence, Prevention and Limitation of Mycotoxins in Feeds. *Anim. Nutr. Feed Technol.* 15:471-490.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2011). Resolução RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.
- Alfonzo EPM, Fernandes T, Castagnara DD, Neres MA, Zambom MA, Oliveira PSR, Ames JP, Radis AC (2011). Qualidade microbiológica de silagem de capim Tifton-85 com e sem pré secagem ao sol. In: XXI Congresso Brasileiro de Zootecnia – ZOOTEC, Universidade Federal de Alagoas.
- Animisha SZ, Jaiswal KK, Pandey P (2012). Integrated Management of Chickpea Wilt Incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Int. J. Agr. Res.* 7(5):284-290.
- Bakhsh A, Iqbal SM, Haq IK (2007). Evolution of chickpea germplasm for wilt resistance. *Pakistan J. Botany* 39(2):583-593.
- Beasley V (1999) Toxicants with mixed effects on the central nervous system. In: *Ibid.* (Ed.), *Veterinary Toxicology International Veterinary Information Service (IVIS)*, Ithaca, NY (www.ivis.org).
- Cao A, Santiago R, Ramos AJ, Marin S, Reid LM, Butrón A (2013). Environmental factors related to fungal infection and fumonisin accumulation during the development and drying of white maize kernels. *Int. J. Food Microbiol.* 164:15-22.
- Cardoso Filho FC, Keller KM, Costa APR, Pereira MMG, Ramirez ML, Muratori MCS (2015). *Fusarium verticillioides* and its fumonisin production potential in maize meal. *Rev. Bras. Ciênc. Agrár. Recife*, 10(4):553-557.
- Cheli F, Battaglia D, Gallo R, Dell'Orto V (2014). EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. *Food Control* 37:315-325.
- Cheli F, Pinotti L, Rossi L, Dell'orto (2013). Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: A review. *Food Sci. Technol. London*, 54(2):307-314.
- Cruz CSA (2013). Emprego de óleos vegetais e glicerina no controle do gorgulho do milho. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Campina Grande – PB, Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, 88 p.
- Del Fava C, Lara MCCSH, Villalobos EMC, Nassar AF, Cabral AD, Torrelli, CS, Cunha MS, Cunha EM (2010). Leucoencefalomalacia (LEME) em equídeos no estado de São Paulo, Brasil: achados anatomopatológicos. *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.* 47(6):488-494.
- Dittrich JR (2010). Comportamento ingestivo de equinos e a relação com o aproveitamento das forragens e bem-estar dos animais. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 39:130-137.
- FAO (2013). *Statistical Yearbook 2013: World Food and Agriculture*. Roma, Itália.
- FDA (Food and Drug Administration) (2001). Federal Register. Guidance for Industry: Fumonisin levels in human foods and animal feeds. U.S. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Center for Veterinary Medicine, November 9, 2001.
- Ferrari E (2011). Métodos e temperaturas de secagem sobre a qualidade físico-química e microbiológica de grãos de milho no armazenamento. Dissertação (Mestrado em Horticultura) Porto Alegre – RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 95 p.
- Ferreira RA (2012). *Suinocultura: Manual Prático de Criação*. Viçosa, MG: prenda Fácil, 443 p.
- Frias AG (2014) Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* e *f.sp. lactucae* obtidos de campos de produção comercial no estado de São Paulo e avaliação de genótipos de alface. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Botucatu – SP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, P 56.
- Gawehns F, Houterman PM, Ait Ichou F, Michiels CB, Hijdra M, Cornelissen BJC, Rep M, Takken FLW (2014). The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2 mediated cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, MN, 27(4):336-348.
- Gimeno A, Martins ML (2011). *Mycotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos*. 3. ed. Miami: Special Nutrients, 129 p.
- Góes EM (2011). *Segurança Alimentar e Qualidade de Alimentos para Cães e Gatos*. *Mais Notícias*, pp. 23-24.
- Gravina M (2011). Milho GM no Brasil. *Revista Agroanalysis*. 31(01):30-31.
- Grenier B, Loureiro-Bracarense AP, Luciola J, Pacheco GD, Cossalter AM, Moll WD, Schatzmayr G, Oswald I.P (2011). Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. *Mol. Nutr. Food Res.* 55:761-771.
- Guaró J (2013) Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Euro. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32 p.
- Iheshiulor OOM (2011) Effects of mycotoxins in animal nutrition: a review. *Asian J. Anim. Sci.* 5(1):9-33.

- Kellerman TS, Marasas WFO, Thiel PG, Gelderblom WCA, Cawood M, Coetzer JAW (1990). Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 57:269-275.
- Knowmycotoxins (2015) Diagnóstico – Equinos: Aflatoxinas Disponível em: <http://www.knowmycotoxins.com/species/equine> Accessed 01 may 2016.
- Kuhnem Júnior PR, Stumpf R, Spolti P, Del ponte EM (2013). Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. *Ciência Rural*, Santa Maria 43(4):583-588.
- Lerayer A (2010). Benefícios dos Transgênicos Chegam a População. *Revista Agroanalysis* 30(2):36.
- Leslie JF, Summerell BA (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Asia, Australia.
- Leslie JF, Summerell BA, Brow RH (2013). *Fusarium Genomic, Molecular and Cellular Biology "An Overview of Fusarium"* by Caizer Academic Press. Norfolk, UK. pp. 1-10.
- Lobato RC, Vargas VS, Silveira ES (2009) Sazonalidade e prevalência de fungos anemófilos em ambiente hospitalar no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Fac. Ciênc. Méd* 11(2):21-28.
- Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, Rooney AP, O'donnell K, Trail, F, Gardiner DM, Manners JM, Kazan K (2013). *Fusarium Pathogenomics*. *Annual Review Microbiology*, Palo Alto, CA, USA, 67(1):399-416.
- Maciel CG (2012). *Fusarium sambucinum* associados a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle. Dissertação (Mestrando em Engenharia Florestal) – Santa Maria – RS, Universidade de Santa Maria, UFSM, 94 p.
- Malmann AO, Marchioro A, Oliveira MS, Minetto L, Wovst LRS, Rauber RH, Dilkin P, Mallmann CA (2013) Dois planos de amostragem para análise de fumonisinas em milho. *Ciência Rural*, Santa Maria, 43(3):551-558.
- Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V (2013). Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* 60:218-237.
- Martinez AS, Franzener G, Stangarlin JR (2010) Dano causado por *Bipolaris maydis* em *Panicum maximum* cv. Tanzânia. *Ciências Agrárias* 31(4):863-870.
- Maxie MG, Youssef S (2007). Nervous system, In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA. 1:358-359.
- Menezes JP, Lupatini M, Antonioli Z I, Blume EJ, Manzoni CG (2010). Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemii*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 34(1):132-139.
- Merrill Junior AH, Sullards C, Wang E, Voss KA, Riley RTS (2001). Phingolipid etabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environmental Health Perspectives*, Res. Triangle Park 109(2):283-289.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Equinos (2014). Disponível em www.agricultura.gov.br Accessed 30 may 2016.
- Negri M, Henriques M, Williams DW, Azeredo J, Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 36:288-305.
- Nene YL, Reddy MV, Haware MP, Ghanekar AM, Amin KS, Pande S, Sharma M (2012). Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. *Information Bulletin No. 28 (revised)*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Oliveira LSF, Koller FFC (2011). Ocorrência de *Aspergillus* spp. e aflatoxinas em amostras de amendoim in natura e paçocas. *Revista de Ciências Ambientais*, Canoas 5(1):57-68.
- Oruc HH, Cengiz M, Kalkanli O (2006). Comparison of aflatoxin and fumonisin levels in maize grown in Turkey and imported from the USA. *Anim. Feed Sci. Technol.* 128:337-341.
- Pacin AM, Ciancio Bovier E, González HHL, Whitechurch EM, Martínez EJ, Resnik SL (2009) Fungal and fumonisins contamination in Argentine maize (*Zea mays* L.) silo bags. *J. Agric. Food Chem.* 57(7):2778-2781.
- Pereira CK, Santos FC (2011). Micotoxinas e seu potencial carcinogênico, Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde 15(4):147-165.
- Pierezan F (2009). Prevalência das doenças de equinos no Rio Grande do Sul, Santa Maria: UFSM, 163 p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Ragsdal JM, Debey BM (2003). Equine leucoencephalomalacia linked to contaminated corn. *Kansas University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service*, 6(2):1-6.
- Ribeiro LB (2009) Avaliação do consumo de nutrientes e água por equinos alimentados com dietas contendo diferentes subprodutos agroindustriais. *Uruguiana*. 16(1):120-133.
- Reid LM, Zhu CA, Parker, And CW, Yan (2009) Increased resistance to Ustilago zeae and *Fusarium verticillioides* in maize inbred lines bred for *Fusarium graminearum* resistance. *Euphytica* 165, 567-578.
- Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RAA, Borges JRJ (Eds). (2007) *Doenças dos Ruminantes e Equinos*. Santa Maria: Palloti, 2:99-222.
- Riet-Correa F, Meireles MA, Soares JM, Machado JJ, Zambrano AF (1982) leucoencefalomalácia associada à ingestão de milho mofado. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2:27-30.
- Rocha MEB, Freire FCO, Maia FEF, Guedes MIF, Rondina D (2014) Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* 36:159-165.
- Sá JC (2014) Identificação dos preditores de preferência aos fenos de alfafa pelos equinos. 2014. 38f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – UNESP, Botucatu/SP.
- Sandoval CMR (2010) Reconocimiento taxonómico preliminar de *Fusarium roseum* (clasificación pendiente) responsable de la pudrición basal del clavel comercial en la sabana de Bogotá. Monografía (Graduação em Biología) – Bogotá, Universidad Militar Nueva Granada, 114 p.
- Santana MCA (2012) Principais tipos de micotoxinas encontradas nos alimentos de animais domésticos. *Revista eletrônica de veterinária*, 13 (7):1-18.
- Scott PM (2012). Recent research on fumonisins: a review, *Food Addit. Contam. Part A*, 29:242–248.
- Shephard GS, Thiel PG, Stockenstrom S, Sydenham EW (1996). Worldwide survey of fumonisins contamination of corn and cornbased products. *J. AOAC Int.* 79:671-887.
- Shephard GS, Berthiller F, Burdaspal PA, Crews C, Jonker MA, Krska R, Macdonald S, Malone RJ, Maragos C, Sabino M, Solfrizzo M, Van Egmond HP, Whitaker TB (2013) Developments in mycotoxin analysis: an update for 2010-2011, *World Mycotoxin J.* 5(1):3-30.
- Santos EL, Cavalcanti MCA, Livia, JE, Meneses, DR (2012) Manejo nutricional e alimentar de equinos, Revisão. *Revista eletrônica Nutritime*. Artigo 174, 9(5):1911-1943.
- Soriano JM, González L, Catalá AI (2005) Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. *Progr. Lipids Res.* 44(6):345-356.
- Souza MLM, Sulyok M, Freitas-Silva O, Costa SS, Brabet C, Machinski Junior M, Sekiyama BL, Vargas EA, Krska R, Schuhmacher R (2013) Cooccurrence of Mycotoxins in Maize and Poultry Feeds from Brazil by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Sci. World J.* pp. 1- 9.
- Silva FC, Chalfoun SM, Batista LR, Santos C, Lima N (2015) Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção flavi: uma revisão. *Revista Iles Ciência*, 1(1):18-40.
- Takken F, Rep M (2010). The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, Oxford, UK, 112:309-314.
- Vieira ER (2012) Aspectos econômicos e sociais do complexo do agronegócio cavalo no Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte. Dissertação de Mestrado, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Womack EDW, Ashli EB, Sparks DL (2014) A recent review of non-biological remediation of aflatoxin-contaminated crops. *J. Sci. Food Agric.* 94:1706-1714.
- Zhao Q, Ran W, Wang H, Li X, Shen Q, Shen S, Xu Y (2013). Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IV1. *BioControl*, Amsterdam, The Netherlands 58(2):283-292.

3. CAPÍTULO II

FUNGOS MICOTOXIGÊNICOS E METABÓLITOS FÚNGICOS EM RAÇÕES PELETIZADAS PARA EQUINOS ADULTOS DURANTE ESTOCAGEM

4. INTRODUÇÃO

Os equinos são animais que possuem exigências nutricionais determinadas basicamente para composição de energia de manutenção e também para a realização de atividades físicas. A determinação da alimentação desses animais deve ser equilibrada, devendo haver balanceamento das proporções adequadas. Os cavalos devem consumir diariamente alimentos com teor de matéria seca proporcional aos seus pesos, ao desempenho esperado e também relacionando com o seu estado fisiológico e nível de atividade física exercida (RIBEIRO et al., 2009; SANTOS et al., 2012).

Na indústria de rações para equinos verifica-se um incremento crescente no controle de qualidade, e isso diz respeito a diversos parâmetros relacionados à constituição do alimento, ao balanceamento, equilíbrio, palatabilidade, digestibilidade e aceitabilidade desses produtos pelos animais. Porém, a principal característica de um alimento está ligada à sua segurança, pois a contaminação oferece risco à saúde animal (GÓES, 2011). Em relação aos procedimentos de fabricação e prevenção contra contaminantes, a legislação brasileira dispõe da Instrução Normativa nº 4, de 23 de fevereiro de 2007, que aborda um Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas de fabricação para estabelecimentos e fabricantes de produtos destinados à alimentação animal, afim de que atendam a requisitos básicos de higiene e de boas práticas para que os alimentos possuam condições livres de contaminantes e qualidade para consumo (BRASIL, 2007).

A contaminação dos alimentos pelos fungos pode comprometer a saúde dos animais, pois esses micro-organismos que estão amplamente distribuídos no ambiente são capazes de reduzir o valor nutritivo e, dependendo da espécie, produzir metabólitos secundários tóxicos que causam doenças nos animais (SILVA et al., 2015).

Um dos principais gêneros fúngicos contaminantes de rações é o *Aspergillus*, classificado entre os fungos de armazenagem. Pode ser encontrado em frutas secas; oleaginosas, como amendoim; e cereais, como milho, aveia, trigo, soja, dentre outros. Em condições de umidade e temperatura elevadas, constituem um sério risco à saúde devido aos seus efeitos tóxicos imediatos, imunossupressores, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. As principais espécies micotoxígenas desse gênero são: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nonius*, *A. tamarii*; *A. versicolor*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. clavatus* e *A. terreus*.

As micotoxinas são produtos resultantes do metabolismo dos fungos, ou seja, são metabólitos secundários que podem afetar tanto a saúde humana quanto a animal. Normalmente estão presentes no ambiente em que se desenvolvem, onde os mais comuns são os alimentos à base de grãos, cereais e rações. Os fatores ambientais que contribuem para a ocorrência de micotoxinas são principalmente a temperatura, ambiente, umidade elevada do substrato associados ao processamento, produção ou armazenamento, além do tipo de alimento (FERREIRA, 2012).

O *A. flavus* e *A. parasiticus* são capazes de produzir as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Essas são as que apresentam os maiores danos aos seres humanos e aos animais, devido à alta toxicidade e à ampla ocorrência. A aflatoxina B1 é produzida por todas as linhagens produtoras de aflatoxinas e é considerada a mais tóxica de todas as 17 diferentes moléculas que o grupo apresenta, lesando principalmente o fígado (ROCHA, 2010; OLIVEIRA; KOLLER, 2011).

Os principais metabólitos tóxicos que essas espécies de fungos produzem estão descritas na Tabela 1

Tabela 3. Principais metabólitos produzidos por fungos em vegetais

Metabólito	Espécie de <i>Aspergillus</i>	Autor
Ácido ciclopiazônico	<i>A. flavus</i> , <i>A. tamarii</i>	Gonçalez et al (2013)
Aflatoxinas	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Maziero (2010)
Citreoviridina	<i>A. terreus</i> , <i>Penicillium citreoviride</i>	Piontelli (2014)
Citrinina	<i>Aspergillus carneus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. hirsutum</i> , <i>P. verrucosum</i>	Samson, Hoekstra e Frisvad, (2004)
Ergina		Cuéllar, 1983
Ergometrina	<i>Claviceps spp.</i>	Khalloub et al., 2007
Ergometrinina		Khalloub et al., 2007
Esterigmatocistina	<i>A. versicolor</i>	Khalloub et al., 2007
Festuclavina	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Schardl; et al., 2006
Fumagilina	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Samson, Hoekstra e Frisvad, (2004)
Fumitremorgenos	<i>A. terreus</i>	Samson, Hoekstra e Frisvad, (2004)
	<i>P. fumigatus</i>	
	<i>P. citrinum</i>	
Fumonisina	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Fusarium subglutinans</i> , <i>Fusarium proliferatum</i>	

Gliotoxina	<i>Alternaria, Aspergillus fumigatus, Penicillium</i>	Ismaiel; Papenbrock (2015)
Griseofulvina	<i>Penicillium grisoflavum</i>	Martins (2016)
Lisergol	ou <i>Penicillium, Claviceps e Rhizopus</i>	Brunton, Goodman e Gilman (2012)
Eimoclavina		
Ocratoxina A;	<i>A. ochraceus, A. niger e A. carbonarius</i>	Samson, Hoekstra e Frisvad, (2004)
Patulina	<i>A. clavatus</i>	Samson, Hoekstra e Frisvad, (2004)
Territrems	<i>A. terreus</i>	LING, et al, 1979
Verruculogen	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Feng et al (2015)
Viriditoxin	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Kundu et al (2014)

Os alcaloides ergóticos são importantes metabólicos secundários fúngicos cuja produção ocorre nos escleródios de fungos do gênero *Claviceps* (conhecido esporão ou cravagem do centeio) em especial da espécie *Claviceps purpurea*, na qual possuem alcaloides peptídeos dividido em dois grupos estruturais alcalóides de aminoácidos (ergotamina) e alcalóides de amins e compostos afins (ácido lisérgico e ergometrina). Esses compostos são responsáveis pela intoxicação causada pela ingestão de produto contaminado desses fungos, conhecido como ergotismo, popularmente como envenenamento por Ergot, fogo de Santo Antônio, fogo sagrado, etc. (HASCHEK et al., 2002; VITAL; ACCO, 2006; KHALLOUB et al., 2007; MORI; NASCIMENTO JUNIOR; MIRANDA, 2013).

Deste modo, objetivou-se neste trabalho quantificar, isolar e identificar a microbiota fúngica, classificar as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, avaliar o potencial toxigênico dos isolados de *Aspergillus* e pesquisar a ocorrência de metabólitos fúngicos em rações peletizadas para equinos adultos durante estocagem.

5. METODOLOGIA

As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos (NUEPPA), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

5.1 Coleta das amostras

As amostras de ração peletizada para equinos adultos foram coletadas de maio a junho de 2016, em três propriedades (denominadas “A, B e C”) com atividade de

equideocultura da cidade de Teresina, PI (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W). Em cada propriedade foram realizadas três dias de coleta. Em cada dia foram coletadas amostras com aproximadamente 200 g diretamente das embalagens de ração que estavam lacradas de fábrica e que foram abertas no momento da primeira coleta (tempo zero-controle). Em seguida as embalagens foram fechadas e estocadas abrigadas da luz e da umidade na propriedade até a realização de nova amostragem. Após três dias de estocagem (tempo três) nova coleta foi realizada após abrir as mesmas embalagens utilizadas anteriormente, em seguida, eram vedadas e estocadas novamente. Este mesmo procedimento foi repetido mais uma vez após três dias (tempo seis).

O manejo das propriedades pesquisadas era semelhante e possuía a mesma forma de fornecimento da ração e armazenamento da mesma. A ração fornecida era peletizada à base de milho moído, farelo de soja, milho laminado, farelo de milho, aveia laminada, vitaminas e minerais.

Após cada coleta, as amostras foram encaminhadas diretamente para o laboratório, para a realização das análises microbiológicas. As amostras foram repartidas assepticamente em duas subamostras iguais com aproximadamente 100g cada e transferidas para sacos plásticos de primeiro uso. Uma das subamostras foi estocada em condições experimentais para simular a embalagem remanescente na propriedade, sendo analisada após o terceiro e no sexto dia da primeira coleta. A outra subamostra foi analisada imediatamente (controle).

Em todas as amostras foram realizadas análises da atividade de água, contagem de fungos filamentosos e leveduriformes e isolamento e identificação dos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp.

5.2 Análise de atividade de água

A atividade de água (A_w) foi determinada utilizando-se um aparelho para leitura modelo Decagon Pawkit digital. De cada amostra, foram retiradas porções individuais com aproximadamente 10 g que foram transferidas para depósito plástico próprio do aparelho. Em seguida, após acoplamento do depósito e estabilização, foi realizada a leitura direta no painel (DECAGON DEVICES, 2016).

5.3 Preparo das amostras para as análises micológicas

No laboratório foi transferida assepticamente uma porção de 25g da ração, para um frasco com 225 mL de água peptonada a 0,1%, formando a diluição inicial (10^{-1}). A partir desta, foram preparadas diluições decimais seriadas até 10^{-3} (SILVA et. al., 2010).

5.4 Quantificação de fungos

A partir das diluições previamente preparadas, foram transferidas alíquotas de 0,1 mL, em placas de Petri contendo agar dextrose batata (ADB) com ácido tartárico a 10%. Em seguida, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do ágar com auxílio de alça de Drigalski (PITT; HOCKING, 2009). As placas de ADB foram incubadas a 25°C por sete dias, em ausência de luz. As contagens fúngicas foram realizadas nas placas que apresentaram entre 10 a 100 UFC/g (DALCERO et al., 1997; DALCERO et al., 1998). Após contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/g), as colônias fúngicas selecionadas para identificação, foram isoladas e repicadas em tubos contendo Agar Malt Extract (MEA).

5.5 Isolamento e identificação de *Aspergillus* spp.

A identificação e isolamento das colônias fúngicas características do gênero *Aspergillus* foram realizadas conforme metodologia recomendada por Klich e Pitt (2002) baseada na semeadura em quatro meios básicos: Czapeky east extract agar (CYA); malt extract agar (MEA) e Czapeky east extract agar 20% sucrose (CY20S).

Para cada cepa característica, foi preparada uma suspensão de conídios em 0,5 mL de meio constituído de 0,2% de agar-agar e 0,05% de Tween 80TM, distribuído em microtubos estéreis (PITT; HOCKING, 2009). A seguir, foi introduzida uma agulha de platina na suspensão de conídios transferindo-os para três pontos equidistantes nas placas contendo CYA; MEA e CY20S, em seguida foram incubadas por sete dias a 25° C. No mesmo momento uma segunda placa de CYA foi preparada e incubada durante sete dias a 37°C.

Após a incubação, visando à identificação das espécies, foram observadas suas estruturas micromorfológicas e as características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma, aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios, pigmento solúvel, produção e cor de exsudato).

5.6 Isolamento e identificação de *Penicillium* spp.

As colônias fúngicas pertencentes ao gênero *Penicillium* foram identificadas utilizando as chaves de identificação baseadas na semeadura em três meios básicos: Czapek Yeast Extract Agar (CYA); Malt Extract Agar (MEA) e 25% Glycerol Nitrat Agar (G25N). Preparou-se uma suspensão de conídios a partir de cada cepa, em 0,5 mL de meio constituído de 0,2% de Agar-Agar e 0,05% de Tween 80TM, distribuído em microtubos previamente esterilizados (PITT; HOCKING, 2009).

A seguir, foi introduzida a agulha de platina na suspensão de conídios, transferindo-os para três pontos equidistantes em uma placa contendo MEA e uma com G25N e incubadas a 25° C por sete dias. Também foi semeada da mesma forma em três placas com CYA que foram incubadas individualmente a 37°C, 25°C e 5°C por sete dias.

Após a incubação, visando à identificação das espécies, foram analisadas as características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma, aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios e pigmento solúvel, produção e cor de exsudado), além de suas estruturas micromorfológicas, observadas em microscópio.

5.7 Isolamento e Identificação de *Fusarium* spp

A partir do Agar dextrose batata (ADB) as cepas características de *Fusarium* spp. foram transferidas para Agar carbationleaft (CLA) para posterior identificação conforme a metodologia proposta por Booth, (1971). A identificação dos conídios realizou-se pelo método de diluição em placa identificada, no qual, a suspensão conidial de cada cepa de *Fusarium* spp. foi incubada em placa com agar-agar a 1,5 % mantido em temperatura ambiente por 16 a 18 horas. Decorrido este tempo, os conídios foram identificados por microscopia (x 30) e transferidos com uma agulha para CLA e ADB.

Após incubação por sete a 14 dias as colônias foram identificadas usando critérios microscópicos e macroscópicos segundo a chave taxonômica de Nelson et al. (1983) para espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*.

5.8 Cromatografia de camada fina (Thin Layer Chromatography-TLC)

Todas as cepas do gênero *Aspergillus* foram testadas para avaliar o potencial de produzir aflatoxinas quando cultivadas em placas MEA a 25 °C por sete dias. Os micélios foram transferidos para microtubos juntamente com 1.000 µL de clorofórmio.

A mistura foi agitada a 4.000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente, logo em seguida, o micélio foi removido e o extrato de clorofórmio evaporado sob fluxo de N₂. O resíduo foi redissolvido em 200 µL de clorofórmio. Os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel 60 F254, TLC chapas de alumínio (20 x 20 cm, espessura, 250 µm, Merck, Alemanha). O líquido carreador foi o clorofórmio: acetona (90:10 v/v). O limite de detecção do método utilizado foi de 5 µg/g (AOAC, 2002).

5.9 Determinação de Aflatoxinas e outros compostos químicos

Para determinação de aflatoxinas e compostos metabólitos proveniente das amostras ração, fez-se a seleção apenas das amostras coletada no primeiro dia (tempo zero) e do sexto dia (tempo seis) de cada análise, com intuito de avaliar se as amostras já estavam contaminadas com aflatoxinas/compostos químicos, ou se adquiriram pela contaminação dos fungos da microbiota da ração após a abertura do saco de ração equina.

A determinação do conteúdo de Aflatoxina B1, B2, G1 e G2 foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta eficiência – LC-MS

5.10 Extração e Purificação dos Extratos

Para extração da aflatoxina nos extratos, utilizou-se a metodologia proposta por Soares e Rodriguez-Amaya, (1989), modificada por Teixeira et al. (2008). foram utilizados 25 g de amostra, na qual adicionaram-se 70,0 mL de metanol e 10,0 mL de solução de cloreto de potássio 4,0%. Em seguida a amostra foi submetida à agitação em liquidificador doméstico por cinco minutos. Após a homogeneização foram adicionados 75,0 mL de solução clarificante (sulfato de amônio 30%) e 7,5 g de celite. Posteriormente, a amostra foi submetida novamente a agitação por cinco minutos, seguido de repouso de 20 minutos. Em seguida, o extrato resultante foi filtrado com auxílio de papel de filtro Watman nº 4.

Do filtrado foi retirada uma alíquota de 50 mL para um frasco tipo *Becker*, em seguida foram adicionados de 50 mL de água destilada. Essa mistura foi transferida para um balão de decantação com capacidade para 500 mL, no qual foram adicionados 20 mL de clorofórmio, logo após, agitou-se manualmente por cinco minutos.

Decorrido esse tempo, foi aberta a torneira do balão para retirada do líquido decantado que foi recolhido para um frasco tipo *Erlenmeyer* com capacidade para 50 mL, depois foram adicionados 20 mL de clorofórmio ao balão e procedeu-se mais uma agitação manual com posterior retirada do líquido decantado, de forma a obter 35 mL da fase clorofórmica no frasco tipo *Erlenmeyer*.

Em seguida, o solvente foi evaporado em banho-maria a 60 °C por aproximadamente 15 minutos. O extrato seco resultante foi suspenso em 1,0 mL de clorofórmio e em seguida homogeneizado em agitador tipo *Vortex*. A suspensão foi acondicionada em frasco âmbar com capacidade de 4,0 mL para posterior evaporação do solvente em capela de fluxo laminar. O extrato seco resultante foi armazenado em *freezer* doméstico (-18°C) até o momento da análise de aflatoxinas.

5.11 Preparo da curva de calibração das aflatoxinas

A solução padrão composta pela mistura das aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 (*Japanese Aflatoxina Mixture 25,0 µg.mL⁻¹, Sigma-Aldrich, ref.CRM40139, lote: XA16905V*), foi diluída seguidamente com metanol grau LC-MS até a obtenção de soluções nas concentrações de 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 250,0 µg.L⁻¹ seguida da análise por LC-MS, para determinação da curva de calibração. Estes procedimentos foram realizados em triplicata.

As aflatoxinas presentes nas amostras foram quantificadas por comparação da intensidade da área de sua banda cromatográfica, em comparação à curva de calibração.

5.12 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Ultra Performance Liquid Chromatography-UPLC) da marca *Shimadzu*, equipado com uma coluna XR-ODS 50mm x 2.0 mm i.d., tamanho de partícula de 2,2 µm, temperatura do forno mantida a 40 °C. A fase móvel empregada constituiu-se de água (Grau LC-MS), contendo 0,1 % de ácido fórmico (v/v; eluente A) e metanol (Grau LC-MS) contendo 0,1 % de ácido fórmico (v/v; eluente B). O fluxo empregado foi de 200 µL.min⁻¹, contendo 5,0% do eluente B durante um minuto, seguido de um gradiente de 5,0 a 98,0 % do eluente B até 12 min, retornando para 5,0 % do eluente B por quatro minutos para recondicionamento da coluna.

O volume injetado foi de 10 μL , com auxílio de um auto-injetor (SIL-20A HT). Os cromatogramas foram monitorados por um espectrômetro de massas *Bruker*, modelo *micrOTOF QII* equipado com uma fonte de ionização por *eletronspray* (ESI), operando no modo positivo, utilizando nitrogênio como gás de nebulização. A pressão do nebulizador foi ajustada para 4,0 bar, o fluxo do gás de secagem para 8,0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura do gás de secagem para 200 $^{\circ}\text{C}$ e a voltagem do capilar foi ajustada para 4.500 V. A calibração do espectrômetro foi realizada com auxílio de formiato de sódio na faixa de m/z 50 a 900.

Figura 2. Cromatograma do padrão das Aflatoxinas G2,G1,B2,B1

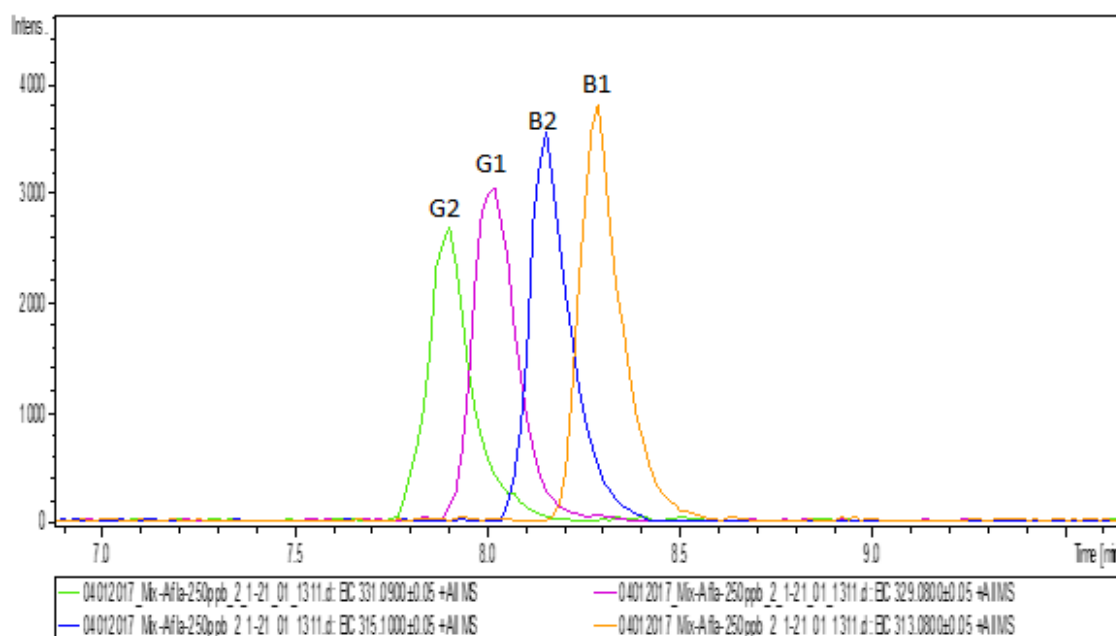
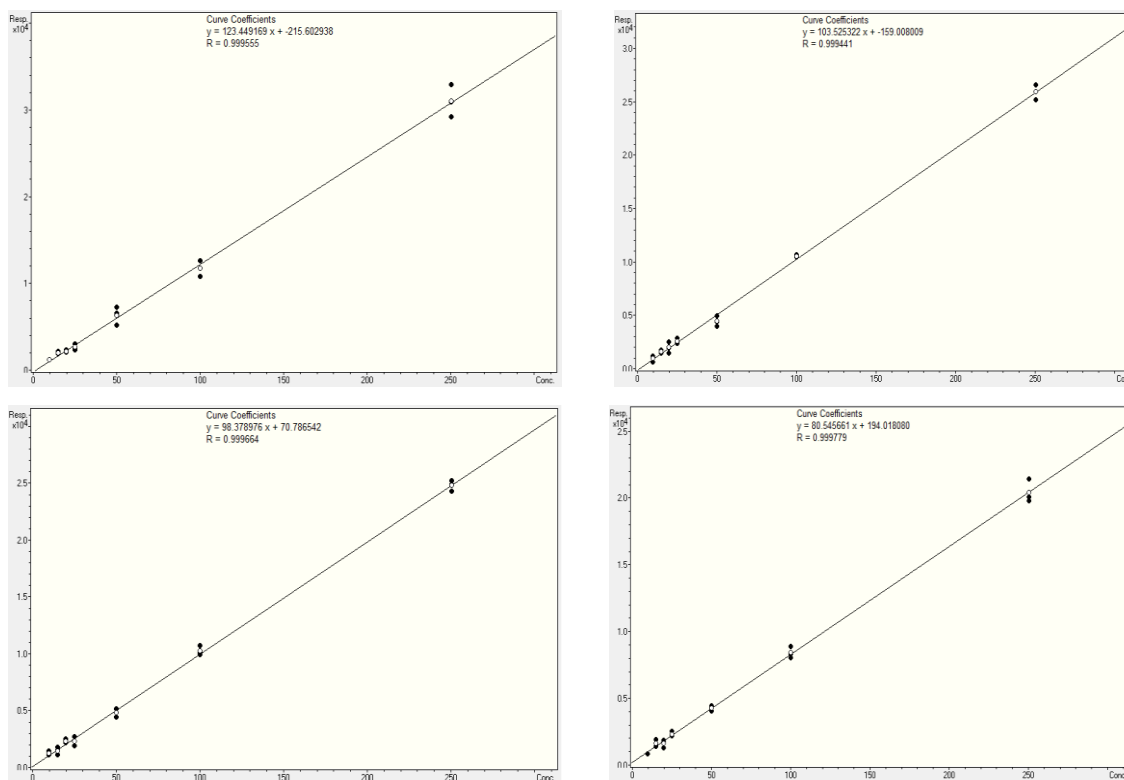


Figura 3. Curvas de calibração para determinação e quantificação das aflatoxinas.



5.13 Análise Estatística:

A pesquisa foi realizada utilizando-se o delineamento em blocos ao acaso com fatorial 3x3 (três propriedades, três coletas). Os resultados quantitativos (contagens) foram transformados em logaritmos para teste da normalidade, análise de variância Kruskal-Wallis e correlação, significância de $p < 0,05$. Os resultados qualitativos (presença) foram analisados pelo teste Qui-quadrado (χ^2).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as propriedades pesquisadas o manejo da distribuição dos alimentos para os animais era realizado de forma similar. Após a abertura da embalagem, a ração era transferida imediatamente para tonéis para ser distribuída para os animais. O manejo era realizado conforme o consumo diário dos animais, de tal forma que não ocorria restos de ração no cocho. Assim, os animais se alimentavam da ração no mesmo momento que havia a abertura da embalagem, portanto, o conteúdo era consumido imediatamente pelos

animais. Desta forma, para atender as necessidades da pesquisa embalagens foram estocadas por seis dias (duração média do saco de ração de 25 Kg nas propriedades analisadas) após a abertura para coleta das amostras no dia zero.

Nas amostras analisadas, pode-se observar que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/g) de fungos filamentosos e leveduras, entre os dias ou condições de armazenamento, seja nas propriedades visitadas ou no laboratório (Tabela 2). Ou seja, a quantidade de fungos filamentosos presentes na embalagem original permaneceu constante após o sexto dia de estocagem.

Tabela 4. Contagens de fungos filamentosos e leveduras (UFC/g em \log_{10}^{x+1}) em amostras de rações peletizadas para equinos, coletadas em propriedades rurais, com análises em tempo zero e após três e seis dias de armazenamento, nas formas controle e em propriedades rurais de Teresina, PI

Propriedade	Contagens de fungos filamentosos e leveduras (UFC/g em \log_{10}^{x+1})				
	Momento da coleta (Controle)	Estocagem no laboratório (em dias)		Estocagem nas propriedades (em dias)	
	Zero (controle)	Três	Seis	Três	Seis
A	3,65	4,10	4,49	3,31	4,43
B	5,00	5,04	5,17	4,17	5,00
C	4,19	4,55	4,14	4,51	3,88
Médias*	4,28 ^a	4,56 ^a	4,60 ^a	4,00 ^a	4,43 ^a

UFC/g em \log_{10}^{x+1} = unidades formadoras de colônias por grama em logaritmos de base dez menos um; *As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

A legislação brasileira não estabelece padrões para contagem de fungos filamentosos e leveduriformes em ração animal, mas o Good Manufacturing Practices recomenda valores inferiores a 6,00 UFC/g em \log_{10} (GMP, 2016). Deste modo, pode-se

constatar que as amostras de ração analisada possuíam contagens fúngicas dentro desses valores recomendados. A contaminação pode estar associada às condições das amostras e as falhas na cadeia de produção (CARDOSO FILHO et al., 2013) e com isso podem comprometer a qualidade do produto, reduzindo a absorção de nutrientes e a palatabilidade da ração.

Valores de contagens de fungos filamentosos e leveduriformes obtidas nas rações para equinos (Tabela 2) foram próximos ao de rações para frango de corte (SANTOS 2011) cujas amostras apresentaram médias entre 3,0 a 5,23 UFC/g em log₁₀. Provavelmente porque a contaminação inicial da matéria prima não foi inativada pelo processamento da ração peletizada.

Observou-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) da atividade de água entre das amostras do grupo controle e as que foram armazenadas no laboratório ou nas propriedades (Tabela 3). As propriedades utilizavam rações comerciais envasadas pela fábrica em embalagens de polietileno de baixa densidade. Por ser impermeável, este material favorecia que a ração, apesar de ser higroscópica, mantivesse umidade (máximo de 12% declarada no rótulo) estável até o momento de utilização. Nas propriedades após abertura da embalagem para a retirada da amostra, eles transferiam todo o conteúdo de ração para tambores de plástico com tampa para uso diário.

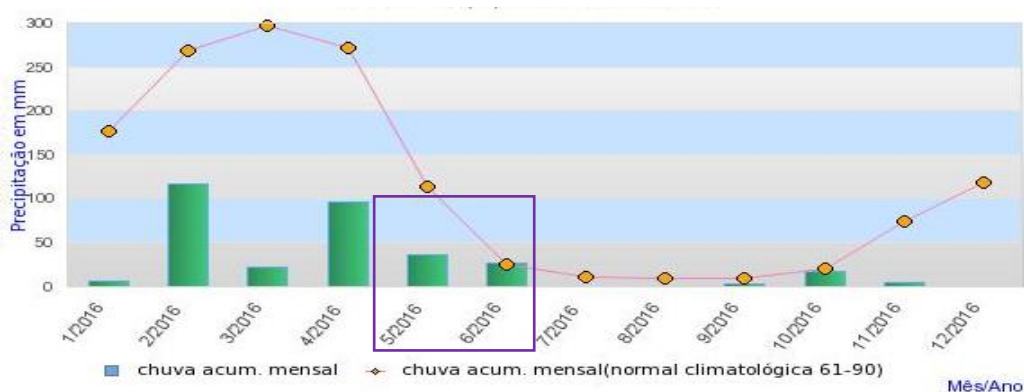
Tabela 5. Média e desvio padrão dos resultados de atividade de água nas amostras de rações peletizadas para equinos, coletadas em propriedade rurais, durante seis dias de armazenamento no laboratório e na propriedade pesquisada, em Teresina, PI

Propriedade	Atividade de água (A_w)				
	Momento da coleta (Controle)	Estocagem no laboratório (em dias)			Estocagem nas propriedades (em dias)
		Zero	Três	Seis	
A	0,67 ± 0,02	0,67 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,67 ± 0,02	0,67 ± 0,02
B	0,67 ± 0,04	0,70 ± 0,04	0,69 ± 0,02	0,66 ± 0,04	0,66 ± 0,04
C	0,73 ± 0,01	0,62 ± 0,01	0,68 ± 0,04	0,70 ± 0,03	0,70 ± 0,01
Médias	0,69 ^a	0,66 ^a	0,68 ^a	0,67 ^a	0,67 ^a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Normalidade ($p<0,05$). Não foi aplicado o teste de comparação de médias por que o F de interação não foi significativo.

No laboratório as amostras foram acondicionadas em depósitos herméticos com tampa. Deste modo, apesar de o experimento ter sido realizado no final da estação chuvosa (Figura 3) provavelmente a embalagem experimental e as condições de estocagem de ração para uso diário das propriedades não favoreceram alteração da atividade de água.

Figura 4. Chuva acumulada mensal e chuva normal climatológica de Teresina durante 2016, com destaque para o período de amostragem.



Fonte: INMET (2017)

A atividade de água (A_w) está relacionada à quantidade de moléculas de água disponíveis nas partículas do substrato, essenciais para a síntese de micro-organismos. De um modo geral, a A_w mínima para o crescimento de fungos filamentosos é 0,80; de leveduras 0,88; de fungos xerofílicos e leveduras osmofílicas 0,61 (PINTO et al., 2006; MELO FILHO; VASCONCELOS, 2011; OLIVEIRA, 2013). No experimento de Gabbi et al. (2011) observaram valores de A_w que variaram entre 0,61 e 0,70 nas amostras de rações para equinos. Estes valores foram próximos aos das amostras de ração analisadas cujos valores oscilaram entre 0,66 e 0,73 (tabela 3). Estes níveis de A_w desfavorecem o crescimento da maioria dos fungos, entretanto os fungos xerofílicos e leveduras osmofílicas teriam condições para desenvolver-se nas rações pesquisadas.

Nas amostras de ração foram isoladas principalmente os gêneros de estocagem: *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. e em menores quantidades, o gênero *Fusarium*, que são considerados de campo (tabela 4). Meilingui (2011) observou-se que das 27 amostras de rações, analisadas 26 estavam contaminadas por fungos dos gêneros *Fusarium* spp. (44,4%), *Aspergillus* (33,3%), *Penicillium* spp. (7,4%).

Tabela 6. Ocorrência (%) de fungos filamentosos isolados das amostras de rações peletizadas para equinos, coletadas em propriedades rurais, durante seis dias de armazenamento no laboratório e na propriedade pesquisada, em Teresina, PI

Gênero Fúngico	Nº de Isolados	Ocorrência (%)
<i>Aspergillus</i>	19	65,5
<i>Penicillium</i>	8	27,6
<i>Fusarium</i>	2	6,9
Total	29	100,0

Dados: Pesquisa Direta.

Das 54 amostras de ração analisadas foram isoladas cinco espécies de *Aspergillus*: *A. japonicus*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. ostianus*; oito cepas de *Penicillium*: *P. citrinum*, *P. funiculosum* e *P. decumbens* e duas espécies de *Fusarium*: *Fusarium verticillioides* e *Fusarium semitectum* (Tabela 5). Pode observar que a ração da propriedade “C” apresentou maior quantidade de fungos isolados, porém em todas as rações apresentavam fungos potencialmente micotoxigênicos, caracterizando risco de intoxicação e de enfermidades para os animais que são fornecidos esses alimentos.

Tabela 7. Espécies do gênero *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp., isoladas em amostras de rações peletizadas para equinos coletadas em propriedades rurais durante estocagem até seis dias no laboratório e nas propriedades pesquisadas localizadas em Teresina, PI.

Propriedades	Espécies fúngicas isoladas nas amostras				
	Momento da coleta (Controle)	Estocagem no laboratório (em dias)		Estocagem nas propriedades (em dias)	
		Três	Seis	Três	Seis
A	<i>A. awamori</i> (1)	-	-	<i>A. awamori</i> (1)	<i>A. awamori</i> (2)
	<i>A. fumigatus</i> (1)			<i>P. citrinum</i> (1)	<i>A. flavus</i> (1)
	<i>P. decumbens</i> (1)				<i>P. funiculosum</i> (1) <i>F. semitectum</i> (1)
B	<i>A. fumigatus</i> (1)	-	-	<i>P. funiculosum</i> (1)	<i>P. citrinum</i> (3)
	<i>A. japonicus</i> (1)				
C	<i>A. fumigatus</i> (1)	-	<i>P. decumbens</i> (1)	<i>A. japonicus</i> (2)	<i>A. japonicus</i> (1)
	<i>A. japonicus</i> (4)			<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>A. ostianus</i> (1)
	<i>A. ostianus</i> (1)			(1)	
	<i>A. flavus</i> (1)				

Espécies do gênero *Aspergillus*, em especial o *A. flavus*, podem ser capazes de produzir de micotoxinas, dentre elas as aflatoxinas, que são mais frequentemente isoladas podem ser carcinogênicas e mutagênicas, caracterizando-se como um grande problema para produção de grãos. Aflatoxicose aguda pode causar morte em animais que consomem rações com elevados teores de aflatoxina. O consumo frequente de rações contaminadas com pequenos teores desta micotoxina pode causar quadros crônicos de aflatoxicose, quando podem ser observados efeitos hepatotóxicos que podem carcinomas hepáticos (CARVALHO, 2013; SINGH, 2015).

A ocratoxina A (OTA) é produzida principalmente por *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* (SAMSON, HOEKSTRA; FRISVAD, 2004) e *A. awamori* (AL-SHEIK, 2014). É outra micotoxina que deve ser pesquisada em alimentos e rações. Esta micotoxina pode ser nefrotóxica, hepatotóxica, teratogênica, carcinogênica e possui propriedades imunossupressoras. Dentre as espécies de *Aspergillus* isoladas (Tabela 5) apenas o *A. awamori* no experimento poderia ser produtor de OTA.

O gênero *Penicillium* pode se desenvolver em substratos variados, em temperaturas elevadas e baixa atividade de água, o que podem ser as causas pelo desenvolvimento desse fungo nas amostras do estudo (CARDOSO FILHO *et al.*, 2011). Neste gênero também ocorrem espécies produtoras de micotoxinas, tais como: ácido penicílico, patulina, citrinina, ocratoxina, fumitremorgeno (SAMSON, *et al.*, (2004), gliotoxina (ISMAIEL; PAPENBROCK 2015), griseofulvina (MARTINS 2016), entre outras. Estas, quando consumidas, causam lesões cromossômicas em células de animais, além de serem carcinogênicas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). O isolamento das espécies de *P. citrinum* e *P. fumigatus* (Tabela 5) nas amostras poderiam ser indicativas de contaminação das rações por citrinina e também festuclavina, fumagilina, fumitremorgeno, gliotoxina, verruculogen e viriditoxin (Tabela1).

A representação de risco pelo isolamento do gênero *Fusarium* em rações para animais se dá pela potencial produção de fumonisinas por determinadas espécies, que tem como principal produtor o *Fusarium verticillioides*, espécie esta que foi encontrada no presente experimento (Tabela 5). Outras espécies que podem produzir essa micotoxina são: o *F. subglutinans* e *F. proliferatum*. Em relação à classificação dessas micotoxinas, são conhecidos cerca de 16 tipos de compostos tóxicos de fumonisinas, sendo a fumonisina B1

a que mais interfere no metabolismo, causando efeitos carcinogênicos no fígado de ratos e, provavelmente, câncer de esôfago em humanos (HERMANNNS et al, 2006; FREIRE et al, 2007). O *F. semitectum*, comum em sementes e pode causar podridão radicular (DHINGRA, 1997), também isolado no experimento (Tabela 5), tem importância devido à contaminação em sementes de culturas dicotiledôneas que crescem em zonas climáticas e também em culturas de leguminosas, como soja e feijão, sendo que é mais comum a colonização de sementes.

Dois isolados de *Aspergillus flavus* das amostras de ração apresentaram a capacidade de produzir aflatoxina quando analisadas em TLC (tabela 6), esta espécie é a principal contaminante de rações e de alimentos, como também o com maior potencial para produção de aflatoxinas (SILVA et al. 2008; GONÇALEZ et al 2013). Desta forma, embora a atividade de água das amostras de ração (Tabela 3) não favoreça a produção de aflatoxinas e do período experimental ter ocorrido em meses com baixa precipitação (Figura 3), é necessário que elas sejam estocadas abrigadas da umidade devido ao potencial toxigênico das cepas isoladas.

Tabela 8. Espécies do gênero *Aspergillus* com capacidade produtora de aflatoxina isoladas nas amostras de rações peletizadas para equinos, coletadas em propriedades rurais em Teresina, PI

Origem da amostra	Espécies	TLC
Propriedade A	<i>Aspergillus flavus</i>	+
Propriedade C	<i>Aspergillus flavus</i>	+

TLC = Cromatografia de camada fina.

Nas amostras analisadas, constatou-se a presença de quatro tipos de aflatoxinas, sendo: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 (tabela 7).

Tabela 9. Níveis detectados de aflatoxinas ($\mu\text{g/Kg}$) em amostras de ração peletizada para equinos adultos coletadas em propriedades rurais em Teresina, PI

Amostra	Aflatoxinas ($\mu\text{g/Kg}$)				Total ($\mu\text{g/Kg}$)
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	
A1	ND	ND	ND	ND	ND
A2	ND	ND	ND	ND	ND
A3	ND	ND	ND	ND	ND
A4	ND	ND	ND	ND	ND
A5	ND	2,5	ND	ND	2,5
A6	ND	0,9	ND	ND	0,9
A7	ND	ND	ND	ND	ND
A8	ND	0,5	ND	ND	0,5
A9	ND	ND	ND	ND	ND
A10	ND	ND	ND	ND	ND
A11	ND	ND	ND	ND	ND
A12	ND	ND	ND	0,1	0,1
A13	0,2	ND	ND	1,6	1,8
A14	ND	3,1	ND	ND	3,1
A15	ND	ND	ND	1,1	1,1
A16	0,7	ND	ND	3,1	3,8
A17	ND	ND	ND	2,7	2,7
A18	ND	2,2	0,9	ND	3,1

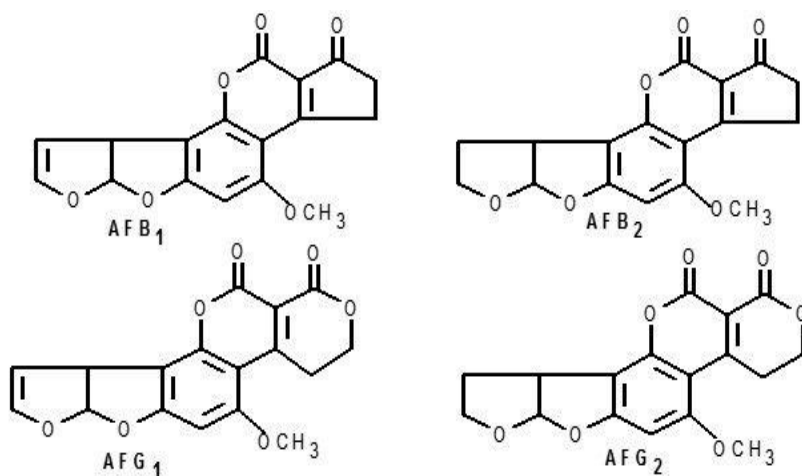
ND: não detectado. AF: Aflatoxina.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 7), 10 amostras (55%) apresentaram a presença de aflatoxinas: duas amostras com AFB1 (11%), cinco amostras com AFB2 (27%), uma amostra com AFG1 (5,5%) e cinco amostras com AFG2 (27%). Pode-se observar ainda que três amostras continham mais de um tipo de aflatoxina. Peluque (2014) encontrou AFB1 em 11 (10,5%) amostras de misturas de cereais, sendo AFG1 em seis (5,7%) e não detectou AFB2 e AFG2. Diante resultados encontrados, a presença das aflatoxinas nas amostras, pode ser provavelmente explicada por condições favoráveis ao desenvolvimento dos fungos produtores dessas micotoxinas nos períodos avaliados e condições de armazenamento, sendo

que, o crescimento fúngico presentes nas amostras, também podem ser inerentes à contaminação intrínseca proveniente da matéria-prima da ração.

A legislação brasileira que dispõe sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos é a Resolução RDC 7 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 18 de fevereiro de 2011. Esta resolução estabelece o limite máximo de 20,0 µg/kg de aflatoxinas totais (B1+B2+G1+G2) para milho em grão, farinhas ou sêmolos de milho, amendoim em casca e descascado, cru ou tostado, pastas e manteiga de amendoim (ANVISA, 2011). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil estabelece o limite de aflatoxinas em rações e alimentos destinados ao consumo animal é de 50 mg/Kg, sendo em alimentos de ingestão direta ou da matéria-prima utilizada para a produção de rações (BRASIL, 2002). Nas amostras avaliadas, as quantificações foram relativamente baixas, com variação de 0,1 a 3,1 µg/kg entre as amostras e com soma de aflatoxinas totais (B1+B2+G1+G2) com variação de 0,1 a 3,8. Ou seja, todas as amostras se encontram dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente.

Figura 5. Estruturas químicas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2

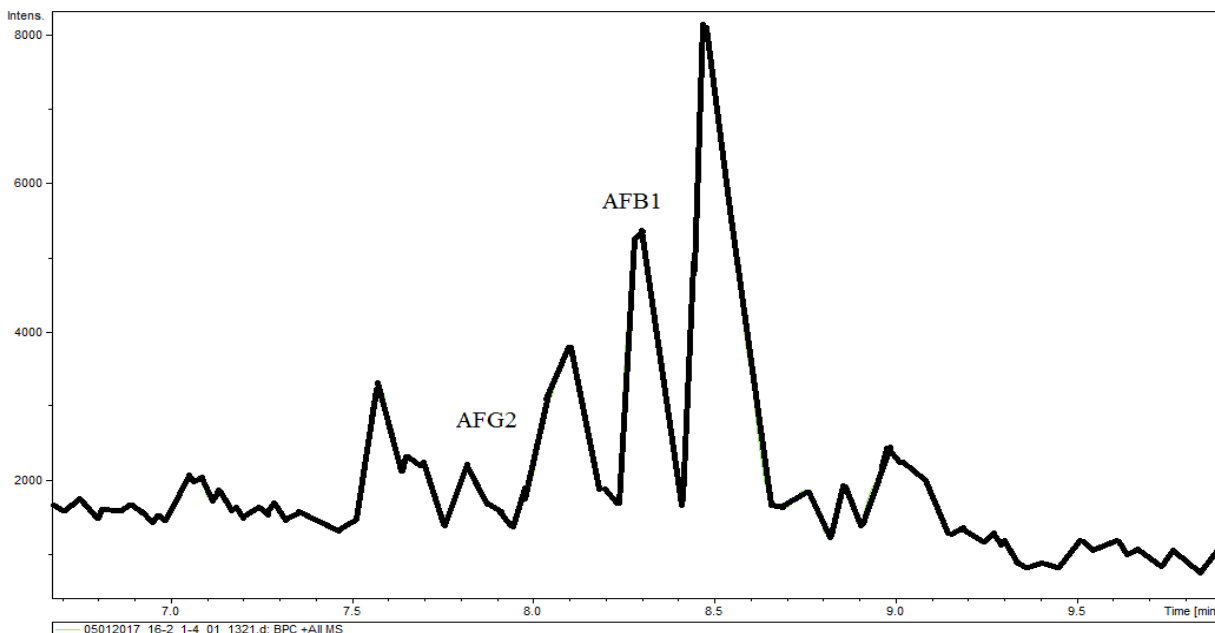


A determinação de aflatoxinas foi realizada das amostras das propriedades, colhidas no momento da abertura da embalagem e no após o sexto dia de armazenamento. Os resultados obtidos mostraram que a propriedade “C” teve o maior número de amostras contaminadas de aflatoxinas, representando seis amostras. As propriedades “A” e “B” tinham duas amostras com aflatoxina cada. O grande percentual na propriedade “C” reflete as

condições de armazenamento desta propriedade e pode ser explicado também pelo grande número de espécies de fungos micotoxigênicos isoladas nesta propriedade, onde só do gênero *Aspergillus* foram 12, uma espécie de *Penicillium* e uma cepa do gênero *Fusarium*.

A amostra 16 de ração da propriedade “A”, onde se isolou uma espécie de *Aspergillus flavus*, apresentou os maiores níveis de quantificação de aflatoxina com o total de 3,8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, com 0,7 de AFB1 e 3,1 de AFG2 (tabela 7). A figura abaixo (Figura 5) mostra o cromatograma com a curva de identificação das micotoxinas AFB1e AFG2 da amostra 16.

Figura 6. Cromatograma de amostra 16 com as aflatoxinas AFB1e AFG2



Apesar das quantificações de aflatoxinas se mostrarem dentro dos limites estabelecidos pela legislação, a presença desses metabólitos se fazem presente como um risco, onde, na maioria das vezes se encontra nos alimentos em concentrações muito baixas (ng/g) de forma a não causar alterações nas propriedades organolépticas, como o sabor e odor, o que dificulta sua constatação pelos consumidores, sendo que apenas um trabalho eficaz das autoridades competentes poderá evitar possíveis intoxicações (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002).

Outros fatores que mostram a relevância do estudo desses metabólitos nos produtos agrícolas, é que alimentos de origem animal também podem estar contaminados por causa do consumo de alimentos contaminados pelos animais, o que leva a um risco de intoxicação humana por via indireta. Resultados de avaliações laboratoriais realizadas nos últimos 10

anos pelo Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) em amostras dos principais ingredientes utilizados na nutrição animal (milho, trigo, arroz, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de soja, silagem e a própria ração) revelaram uma prevalência média de 41% para aflatoxinas (MALLMANN, 2014).

As aflatoxinas possuem efeito hepatóxico, carcinogênico e imunotóxico, sendo o fígado o órgão alvo da ação da aflatoxicose no organismo animal e humano. Os estudos científicos demonstram que normalmente animais jovens são os mais afetados. Os principais sinais clínicos são a perda de apetite, letargia, fraqueza e morte. Dentre os metabólitos analisados, a aflatoxina B1 (AFB1) é apontado como a mais importante na área de alimentos devido à sua elevada capacidade hepatotóxica e em maiores concentrações nos substratos (MALLMANN; DIKIN, 2011).

Nos resultados obtidos pela cromatografia de massa das amostras de ração, obteve-se a identificação de cinco tipos de compostos químicos: ergina, ergometrina, festuclavina, griseofulvina e o lisergol (tabela 8).

Tabela 10. Determinação de metabólitos fúngicos por cromatografia de massa das amostras de ração peletizada para equinos

Metabólito	Fórmula	Origem das amostras		
		Prop. A	Prop B	Prop C
Ergina	$C_{16}H_{17}N_3O$	13	ND	5, 15 e 17
Ergometrina	$C_{19}H_{23}N_3O_2$	11	ND	ND
Festuclavina	$C_{16}H_{20}N_2$	2, 13 e 16	4, 7 e 18	17
Griseofulvina	$C_{17}H_{17}ClO_6$	ND	ND	8
Lisergol	$C_{16}H_{18}N_2O$	ND	ND	15
Total	-	5	3	6

ND: não detectado

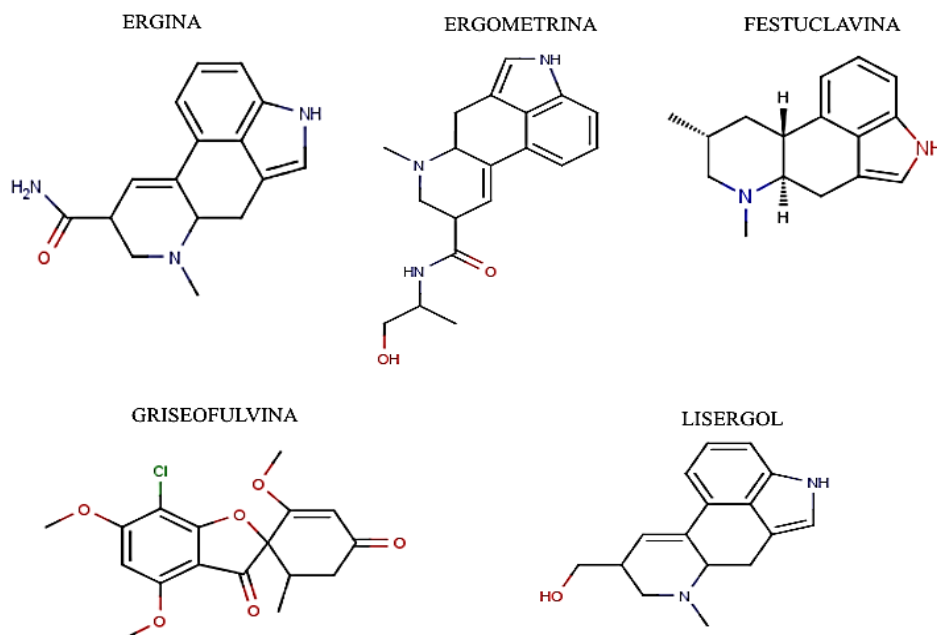
Esses compostos foram encontrados em 11 amostras das diferentes propriedades analisadas, onde alguns aparecem em mais de uma amostra, totalizando 14 metabólitos identificados, sendo que, a propriedade C teve o maior número metabólitos encontrado (seis), seguido da propriedade A, com cinco, e a propriedade B apresentou em apenas três amostras. Destaca-se também a presença da festuclavina, em seis das amostras e para a ergina em quatro

(tabela 8), esses metabólitos são caracterizados por serem alcaloides de Ergot e potencialmente produzidos por plantas e fungos micotoxigênicos.

A União Europeia estimula valores sobre as quantidades máximas de escleródios (estrutura de resistência do fungo) tolerados na alimentação animal de 1 g / kg, correspondendo aos alcalóides de cravagem em centeio em concentração de alimentação de aproximadamente 1,5-6,5 g / kg (UE 2002).

Em uma pesquisa conduzida por Liesener et al (2010), em 21 propriedades com criatórios para equinos, com um total de 62 amostras de ração para cavalos, com misturas de cereais , realizando as coletas com 21 propriedades produtoras de cavalo, revelou-se que as amostras tinham a presença de alcalóides ergotamínicos em um total genérico de 30 mg / kg, equivalendo a 132%. Valores estes, são considerados altos e representam um grande perigo aos animais que ingerem em sua alimentação. Fayrer-hosken et al (2013), com o objetivo de investigar o efeito dos alcalóides nas funções reprodutivas de seis garanhões, forneceram uma dieta com e sem sementes tóxicas de festuca (planta toxica rica em alcaloides) em um período de 70 dias, os autores concluíram que os alcalóides da cravagem do centeio diminuíram o volume livre de gel com o consumo altos níveis de alcalóides, com efeitos estatisticamente significativos sobre o espermograma de garanhões reprodutores. Esses resultados mostram que a alimentação com presença de compostos tóxicos como os alcaloides podem levar os animais a alterações desde enfermidades graves, até a morte.

Figura 7. Fórmulas científicas dos compostos químicos encontrados na ração



A ergina (amida de ácido D-lisérgico) ou LA-111, identificada em quatro amostras, é um alcalóide da família das ergolinas, presente em algumas espécies do reino vegetal, *Ipomoea violacea*, a *Ipomoea tricolor*, *Argyrea nervosa* e no fungo *Claviceps purpurea*. É uma substância conhecida pelos seus efeitos alucinógenos, semelhantes aos efeitos do LSD, mas também usado como sedativo (CUÉLLAR, 1983).

No Brasil, segundo a Resolução RDC nº 39 de Julho de 2012 da ANVISA, a ergina passou a ser considerada uma substância psicotrópica sob controle especial, tornando a *Ipomoea violacea* uma planta ilegal, diferente de muitos países, onde tal planta não foi posta sob controle (ANCUCEANU et al., 2010).

A ergometrina, identificada em uma das amostras, está entre os mais potentes alcaloides de ergot, atua rapidamente como ocitócico, com pouco efeito vasoconstritor, atua como agonista parcial dos receptores α - adrenérgicos nos vasos sanguíneos e possui pequena ação como antagonista, além disso, atua de modo semelhante em receptores serotoninérgicos (HASCHEK et al., 2002; VITAL; ACCO, 2006; KHALLOUB et al., 2007).

A Festuclavina, identificado em sete amostras, é um metabólito secundário, caracterizada por o sistema de anel tricíclico exemplificado pelo aldeído chanoclavina-I ,

alcalóide do Ergot comumente produzido pelos *Claviceps purpurea*, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium roquefort* (SCHARDL; et al., 2006). No presente trabalho foram isoladas espécies de *Aspergillus fumigatus*, o que pode ser resultante do seu metabolismo.

Eles possuem efeitos antibióticos específicos e também efeitos tóxicos, dentre eles, a festuclavina. Esse metabolito pode interferir no sistema de regulação dos mamíferos da captação de serotonina, dopamina e adrenalina e fumagilina (ARÍSTEGUI, 2002; BOK, 2006).

A griseofulvina, encontrada em uma amostra, é derivada do metabolismo secundário do fungo *Penicillium griseofulvum* e em 1946, Brian et al publicou resultados dos seus estudos na qual havia sido descoberto uma substância isolada a partir do *Penicillium janczewskii* denominado “fator de ondulação” devido as ondulações emitidas pelas hifas fúngicas e que em 1947 essa substância e a griseofulvina eram de fato a mesma substância (MARTINS, 2016).

Vastamente utilizada com um antibiótico com ação antifúngica utilizada amplamente no tratamento de doenças causadas por fungos patogênicos, doenças inflamatórias, usada no tratamento de humanos e animais no combate a micoses epiteliais na pele, unhas e na agricultura (ZHAO, 2012).

O lisergol, encontrado em uma amostra, também é identificado como uma hidroxietilamida do ácido lisérgico, além de novos derivados do ácido lisérgico simples: Lisergol, Lisergina e Lisergeno. Essas micotoxinas são ativas contra bactérias, nematódeos, insetos e mamíferos. O composto é isolado de gêneros de fungos inferiores: *Claviceps*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Também isolado a partir de plantas *Rivea corymbosa*, *Ipomoea* plantas superiores *violacea* e *Ipomoea muricata* (BRUNTON; GOODMAN; GILMAN, 2012).

7. CONCLUSÕES

1- A quantidade de fungos filamentosos e a atividade de água presentes na embalagem original permanecem constantes após seis dias de estocagem.

2- As rações peletizadas para equinos possuem predominantemente fungos de estocagem dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e de *Fusarium* com as seguintes respectivas espécies:

A. japonicus, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. ostianus*, *P. citrinum*, *P. funiculosum*, *P. decumbens.*, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium semitectum*.

3- As cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de rações nas propriedades analisadas produzem aflatoxina.

4- Foram encontradas quatro tipos de aflatoxinas, sendo: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e os compostos químicos: ergina, ergometrina, festuclavina, griseofulvina e o lisergol.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos sobre micotoxinas na alimentação de equinos são raros e basicamente estão restritas a fumonisinas, devida à importância da leucoencefalomalácia. Outros metabólitos fungicos, como os alcaloides de ergot, merecem mais atenção pela comunidade científica e também pelos produtores de ração. Pois, outros grupos de compostos tóxicos produzidos por fungos podem estar presentes em rações para equinos e que não são pesquisados rotineiramente pela comunidade científica. Esses metabólitos provocam uma série de doenças que não associadas, mas merecem mais atenção para a prevenção e resolução clínica de futuros casos.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev. 2011. Seção 1, p. 72-73.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC 39, de 9 de julho de 2012. Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias entorpecentes, psicotrópicas, precursoras e outras sob controle especial, da portaria SVS/MS nº 344. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2012.

AL-SHEIKH, H. M. LAMP-PCR detection of ochratoxigenic *Aspergillus* species collected from peanut kernel. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.1, p. 634-644, jan. 2015.

ANCUCEANU, R. V.; DINU, M.; ANGHEL, A. I.; REBEGEA, O. C.; OLARU, O. T.; POPESCU, D.; POPESCU, G. Recent Prohibition of Certain Psychoactive “Ethnobotanicals” in Romania. *Farmacia*, v. 58, n. 2, p. 121-127, 2010.

AOAC. ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 15th. Supl 2, ed. 1998.

AOAC. ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 17th ed. Washington: AOAC, 2002.

ARÍSTEGUI, B. *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Rev Iberoam Micol** 2002.

BENTO, L. F. **Qualidade física e sanitária de grãos de milho armazenados em Mato Grosso**, 2011. 71 f. Dissertação (mestrado em Agronomia tropical). Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT. 2011.

BOK, J.W.; CHUNG, D. ; BALAJEE, S.A. ;MARR, K.A. ;ANDES, D. ;NIELSEN, K.F.; FRISVAD, J.C.; KIRBY, K.A; KELLER, N.P.; GLI, Z. a transcription al regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. **Infect Immun.**; 74:67616768. 2006.

BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Surrey: Commonwealth Mycological Institute. . 237p. 1971.

BRASIL. Instrução Normativa n° 4, de 23 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à Alimentação Animal e o Roteiro de Inspeção. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 mar. 2007. Seção 1, p. 5.

BRUNTON, L.L. GOODMAN; GILMAN: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Rev Saude Publ**, vol. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CALVET, R.M. **Isolamento e identificação de fungos toxígenos em carcinicultura marinha**. 81 f., 2008. Dissertação de mestrado em Ciência Animal, Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. – v. 1, n.3 (2015) Brasília,2015.

CARDOSO FILHO, F. C.; CALVET, R. M.; ROSA, C. A. R.; PEREIRA, M. M. G.; COSTA, A. P. R.; MURATORI, M. C. S. Monitoramento de Fungos Toxigênicos e Aflatoxinas em Rações Utilizadas em Piscicultura. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.14, n.3, p. 305-311, jul./set. 2013.

CARDOSO, F. C. FILHO, MURATORI, M. C. S. **Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas na piscicultura em Teresina, Piauí, Brasil**, 2011. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, Teresina.

CARVALHO, L. I. C. **Aspergillus e Aspegilose: Desafos no combate da doença**. 2013. 43 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

CUÉLLAR A. Química de los fármacos naturales. La Habana: Empresa de Producciones del M.E.S;.P. 255,390. 1983.

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

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

DECAGON DEVICES, Inc. 2365 NE Hopkins Court, Pullman, USA, WA 99163 10341, 2016.

DHINGRA, O.D. Internally seedborne *Fusarium semitectum* and *Phomopsis* sp. affecting dry and snap bean seed quality. **Plant Disease Reporter** 62:509-512. 1978.

EU. European Union. **Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed**. OJ L 140, 0.5.2002, p. 10–21. 2002.

FAO/WHO. Food and Agricultural Organization and World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **WHO technical report series**; no. 966, 2011.

FAYRER-HOSKEN, R. A.; HILL, N. S.; HEUSNER, G. L.; TRAYLOR-WIGGINS W. ; TURNER, K. The effects of ergot alkaloids on the breeding stallion reproductive system. **Equine Veterinary Journal**, **45**, Suppl. 45 (2013) 44–47, 2013.

FENG, Y.; HOLTE, D.; ZOLLER, J.; UMEMIYA, S.; SIMKE, L. R.; BARAN, P. S. Synthesis of Verruculogen and Fumitremorgin A. **Synfacts**, *11*(11), 1127-1127. 2015.

FERRARI FILHO, E. **Métodos e temperaturas de secagem sobre a qualidade físico-química e microbiológica de grãos de milho no armazenamento.** 2011, Mestrado em ciência da planta, Faculdade de Agronomia da UFRGS, fevereiro, Porto Alegre, RS, 2011.

FERREIRA, R.A. **Suinocultura: Manual Prático de Criação.** Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2012. 443 p.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. As micotoxinas. Revista Food Ingredients. América do Sul, n. 7, p. 33-40, 2009.

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**, Fortaleza. Documentos 110, 1.ed. 2007.

GABBI, A. M.; CYPRIANO, L.; PICCININ, I. Aspectos microbiológicos e físico-químicos de três rações comerciais sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.12, n.3, p.784-793 jul/set, 2011.

GONÇALEZ, E., DA SILVA, J. L., DOS REIS, T. A., NAKAI, V. K., FELICIO, J. D. A. CORRÊA, B. Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. **Arquivos do Instituto Biológico**, 80(3), 312-317. 2013.

GÓES, E. M. Segurança Alimentar e Qualidade de Alimentos para Cães e Gatos. **Mais Notícias**, 2011.

GMP. GMP + BA1 Specific Feed **specific feed safety limits**. 84 p. 2016. Disponível em <https://www.gmpplus.org/pagina/9/standards.aspx> acesso em 19 jan 2017

HASCHEK, W. M.; VOSS, K. A.; BEASLEY, V. R. Selected Mycotoxins Affecting Animal and Human Health. In: HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G.; WALLING, M.

A. **Handbook of Toxicologic Pathology**. v.1 2.ed. San Diego: Academic Press, p.683-690. 2002.

HERMANNNS, G.; PINTO, F. T.; KITAZAWA, S. E; NOLL, I. B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, jan./mar. 2006.

IAMANAKA, Beatriz Thie; OLIVEIRA, Idjane Santana; TANIWAKI, Marta Hiromi. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 138-161, 2013.

INMET. Instituto Nacional de Metereologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Tempo/Gráficos**, 2017 Disponível em <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo/graficos>> acesso em 20 janeiro 2017.

JUNQUEIRA O. M.; DUARTE K. F. Importância da qualidade das matérias-primas para a produção de rações para frangos de corte. 2009. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos/importancia-qualidademateriasprimas-producao-t134/141-p0.htm>>. Acesso em: 10 Jan. 2017.

KHALLOUB, P.; DIAB, S.; LICOFF, N.; BENGOLEA, A.; LÁZARO, L.; CANTÓN, G.; ODRIOZOLA, E. Efecto del consumo de *Claviceps purpurea* em bovinos em engorde. **Sitio Argentino de Produção Animal**, v.88, n.2, p.68-72, 2007.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. CSIRO - Division of Food Processing, Austrália, 2002.

KUNDU, S.; KIM, T. H.; YOON, J. H.; SHIN, H. S.; LEE, J.; JUNG, J. H.; KIM, H. S. Viriditoxin regulates apoptosis and autophagy via mitotic catastrophe and microtubule formation in human prostate cancer cells. **International journal of oncology**, 45(6), 2331-2340. 2014.

LIESENER K.;CURTUI,V.;DIETRICH, R. ;MÄRTLBAUER,E. ;USLEBER,E.;
Mycotoxins in horse feed. **Mycotox Res**, 2010,26:23–30

MAIA, J. T. L. S.; SAKATA, R. A. P.; SABBAG, S. P. Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades. **Enciclopédia Biosfera**, vol. 7, n. 13, p. 1477-1498, 2011.

MALLMANN, C.A.; DIKIN, P. Mycotoxins and Mycotoxicoses in **Swine. Special nutrients: the Mycotoxins specialist**, 2011.

MALLMANN, C. A. Micotoxinas: como gerenciar o risco e minimizar o problema. **Rev AviSite**, n. 86, p. 66, set. 2014.

MARTINS, G. F. **Prospecção de griseofulvina, um potente antimicótico, em fungos endofíticos do gênero *Xylaria sp.* isolados de espécies vegetais do Cerrado.**2016, Dissertação, pós-graduação em química, Universidade Estadual Paulista Araraquara 2016.

MEILINGUI, L. O. **Análises micotoxicológicas em rações comercializadas no oeste de santa catarina**, 2011.Trabalho de conclusão de curso (TCC). Instituto Federal Catarinense.Concórdia-SC, 2011.

MELO FILHO, A. B.; VASCONCELOS, M. A. S. **Química de Alimentos**. Recife: UFRPE, 2011.78p.

MORI, C.; NASCIMENTO JUNIOR, A.; MIRANDA, M. Z. Aspectos econômicos e conjunturais da cultura do centeio no mundo e no Brasil. Passo Fundo: **Embrapa-CNPT**, 2013.

OLIVEIRA, A. C. **Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de manga (*Mangífera indica l.*)**.

Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 60p, 2013.

OLIVEIRA, L. S. F., KOLLER, F. F. C. Ocorrência de *Aspergillus* spp. e aflatoxinas em amostras de amendoim in natura e paçocas. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, 5 (1): 57-68. 2011.

PELUQUE, E. **Isolamento, identificação molecular e potencial toxigênico de fungos e ocorrência de micotoxinas em misturas de cereais. comercializadas no Brasil.** 2014(Dissertação) Universidade de São Paulo faculdade de zootecnia e engenharia de alimentos. 2014.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Rev. Quím. Ind.**, n.724, p.17-20, 2006.

PIONTELLI, E. Agentes comunes en las aspergilosis humanas: conceptos primarios en la diferenciación de sus complejos de especies. **Boletín Micológico**, v. 29, n. 2, 2014.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and spoliage.** 2 ed. London: Blackie academic and Professional, 2009.

RIBEIRO, L.B, et al. Avaliação do consumo de nutrientes e água por equinos alimentados com dietas contendo diferentes subprodutos agroindustriais. **Uruguiana.** v. 16, n,1, p.120-133, 2009.

ROCHA, L. O. **Distribuição de fungos e micotoxinas em grãos de milho recém-colhidos e variabilidade das cepas de *Fusarium verticillioides* e *Aspegillus flavus* isoladas.** Tese (Doutorado em Microbiologia) – São Paulo – SP, Universidade de São Paulo, USP, 174p. 2010.

SANTOS, E.L; CAVALCANTI, M.C.A; LIVIA, J.E; MENESES, D.R. Manejo nutricional e alimentar de equinos - **Revisão. Revista eletrônica Nutritime**. Artigo 174, v. 9, n.5, p. 1911 – 1943, 2012.

SANTOS, Y. F. M. ; GUIMARÃES, C. M. M. ; NUNES, E. M. C. G. ; CALVET, R. M. ; FERREIRA, L. C. R. P. ; MURATORI, M. C. S. . Fungos toxígenos em rações para frango de corte produzidas em Teresina, Piauí. **Higiene Alimentar** , v. 25, p. 533-534, 2011.

SCHARDL, C. L., PANACCIONE, D. G. & TUDZYNSKI, P. (2006). **Alkaloids Chem. Biol.** 63, 45–86.

SILVA, F. C.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R.; SANTOS, C.; LIMA, N. (2015) Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção *flavi*: uma revisão. **Revista IFES Ciência**, 1(1): 18 – 40.

SILVA, J. S.; BERBERT, P. A.; RUFATO, S. AFONSO, A. D. L. Indicadores da qualidade dos grãos. In: Silva, J. S. (Ed.). Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. Viçosa, MG: **Aprenda Fácil**, 63-107, 2008.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 624 p.

SINGH, D.; RADHAKRISHNAN, T.; KUMAR, V.; BAGWAN, N.B.; BASU, M.S.; DOBARIA, J.R.; MISHRA, G. P; CHANDA, S.V. Molecular characterisation of *Aspergillus flavus* isolates from peanut fields in India using AFLP. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.3, p. 673-682, 2015.

SAMSON, R. A., HOEKSTRA E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food-and airborne fungi**. No. Ed. 7. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 2004.

SOARES, L. M. V. , RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 72:22-6, 1989.

TEIXEIRA, A.S.; FREITAS-SILVA, O.; GODÓY, R.L.O.; VARGAS, E.A.; MARTINS, A. Análise e quantificação de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência(CLAE) em amostras de castanha-do-Brasil. **Revista Ciência da Vida**, Seropédica, v.28, p.22-24, 2008.

VITAL. M. A. B. F.; ACCO, A. **Agonistas e antagonistas adrenérgicos**. In: SPINOSA, H. de S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI. M. M. Farmacologia aplicada a medicina veterinária. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ZHAO, J. H.; ZHANG, Y. L.; WANG, L. W.; WANG, J. Y.; ZHANG, C. L. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 2107-2112, 2012.