

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO MICOLÓGICA DE RAÇÕES COMERCIAIS PARA CÃES E GATOS E  
POTENCIAL MICOTOXINOGÊNICO DE ESPÉCIES SELECIONADAS.**

**MARINA VENTURINI COPETTI**

PORTO ALEGRE

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO MICOLÓGICA DE RAÇÕES COMERCIAIS PARA CÃES E GATOS E  
POTENCIAL MICOTOXINOGÊNICO DE ESPÉCIES SELECIONADAS.**

Autor: MARINA VENTURINI COPETTI

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Veterinárias. Subárea: Microbiologia.  
Especialidade: Micologia

Orientador: PROF. DR. LAERTE FERREIRO

Co-orientador: PROF. DR. JANIO M. SANTURIO

PORTO ALEGRE

2005

C782a Copetti, Marina Venturini

Avaliação micológica de rações comerciais para cães e gatos e potencial micotoxicogênico de espécies selecionadas / Marina Venturini Copetti - Porto Alegre: UFRGS, 2005.

68f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2005. Laerte Ferreiro, Orient. , Janio M. Santurio, Co-orient.

1. Microbiologia de alimentos 2. Micologia  
3. Micotoxinas 4. Ração 5. Meios de cultivo 6. Fungos em alimentos I. Ferreiro, L. , Orient. II. Título

CDD 616.01

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Veterinária da UFRGS

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

*-Leonardo da Vinci-*

*Dedico à:*

*Meus pais, Aneli Maria e Francisco Luiz Copetti*

*Minhas irmãs, Débora e Francieli Venturini Copetti*

*Pelo incentivo, apoio constante e sobretudo por serem parte fundamental de minha vida.*

## AGRADECIMENTOS:

À força superior que nos rege: *“A razão me diz que Deus existe, porém também diz que nunca poderei saber o que Ele é”*. -Voltaire-

Ao Profº Janio Santurio, por ter me cativado a esta área encantadora que é a micologia, pelos ensinamentos, confiança, amizade e oportunidade de desenvolver este trabalho. *“O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra”*. -Aristóteles-

Ao Profº Laerte Ferreira, pela oportunidade, orientação e confiança: *“Habilidade não é nada sem oportunidade”*. -Napoleon Bonaparte-

Ao Profº Sydney Hartz Alves, pelo exemplo, incentivo e confiança. *“Trate as pessoas como se elas fossem o que poderiam ser e você as ajudará a se tornarem aquilo que elas são capazes de ser”*. -Goethe-

Às Prof<sup>as</sup> Cecília Farnochi e Adriana Torres pelos ensinamentos de ecofisiologia e taxonomia de *Fusarium*. *“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”*. -Eleanor Roosevelt-

À Dr<sup>a</sup> Marta Taniwaki pelos ensinamentos sobre *Penicillium* e principalmente pela confiança depositada. *“A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa, transformam-se em oportunidades”*. -Maxwell Maltz-

À Edna M. C. Sanches pelos conselhos, carinho, paciência e especialmente por sua amizade incondicional. *“A glória da amizade não é somente a mão estendida, o sorriso carinhoso ou a prazerosa companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você”*. -Ralph Waldo Emerson-

À Beatriz Thie Iamanaka pela amizade e ensinamentos nas análises de micotoxinas. *“As circunstâncias do presente não determinam onde você pode ir, elas meramente determinam onde é o começo.”*-Nido Qubein-

Aos queridos amigos encontrados no LAPEMI: Adriana e Alexandre Leal, Ana Áurea Boeck, Ana Dieice Mario, Andréia Henzel, Ayrton Cavalheiro, Carolina Silveira, Deise Santurio, Josiane Faganello, Juliana Argenta, Leila Aguiar, Liliane Scheid, Liziane Calza e Taiane Mario; pelo companheirismo, carinho, auxílio e agradáveis momentos profissionais e pessoais compartilhados. *“Só existe uma coisa melhor do que fazer novos amigos: conservar os velhos”*. -Elmer G. Letterman-

Aos amigos da UFRGS: Adriana Muschner, Prof<sup>a</sup> Ana Paula Ravazzolo, Carla Rodenbusch, Clarissa Vaz, Cristiana Portz, Elsio Wunder Jr, Ezymar Cayana, Fabrício Bortolanza, Izamara Oliveira, Josiane Griebeler, Laurício Rubin, Márcia Andreazza, Marisa Macagnan, Simone Simionatto e Ubirajara Costa; pelo apoio, amizade e momentos de alegrias e incertezas divididos. *“Quantas injustiças podem ser esquecidas no abraço de um amigo. A amizade é o mais perfeito dos sentimentos porque é livre...”* -Rousseau e Lacordaire-

Aos amigos e familiares que, apesar de não citados nominalmente, participaram desta conquista. *“... e descobrimos que o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida”*. -Autor desconhecido-

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, por participarem e possibilitarem a realização deste mestrado. *“O primeiro problema para todos não é aprender, mas aprender a desaprender para então re-aprender”*. - Gloria Steinem-

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida. *“Democracia é oportunizar a todos o mesmo ponto de partida. Quanto ao ponto de chegada, dependerá de cada um.”* -Fernando Sabino-

## RESUMO

A eficácia dos meios ágar batata acidificado, ágar dicloram rosa de bengala e cloranfenicol e ágar dicloram glicerol 18% foi comparada para isolamento e quantificação de fungos a partir da análise de 54 amostras de rações comerciais secas para cães e gatos (34 para cães e 20 para gatos), produzidas por 9 empresas. A atividade de água das amostras foi quantificada, apresentando valores entre 0,45 e 0,82. Em 74% das amostras foi detectada a presença fúngica, onde, além de fungos com micélio estéril e leveduras, 23 gêneros de fungos foram identificados. As 40 amostras positivas apresentaram níveis de contaminação, com contagens variando entre  $10^1$  e  $10^3$  UFC/g. Não se verificou correlação entre atividade de água e contaminação fúngica e não se observou diferença significativa entre o número de colônias isoladas e os diferentes meios de cultivo utilizados. Apesar disto, o DG18 foi o meio que apresentou melhores resultados tanto na quantidade quanto na variedade de fungos isolados. Comparando-se os resultados obtidos com diferentes meios observa-se que os microrganismos isolados dependem dos meios de cultivo empregados. O gênero *Aspergillus* e a espécie *Aspergillus niger* foram os mais freqüentemente isolados. Isolados pertencentes a espécies potencialmente produtoras de aflatoxinas e ocratoxina A foram avaliados através do método de ágar plug-TLC. Vinte por cento dos *A. flavus* isolados produziram aflatoxina B1, todos os isolados de *A. ochraceus* produziram ocratoxina A e nenhum isolado de *A. niger* foi detectado como produtor de ocratoxina através do método de *screening* utilizado. A avaliação fúngica realizada com o emprego de 3 meios de cultura tornou claro que a detecção de fungos é dependente do meio de cultura utilizado. A  $A_w$  do alimento e do meio também devem ser consideradas para que as análises microbiológicas possam detectar ou valorar a micobiota que, efetivamente, está contaminando o alimento.

**Palavras chaves:** Micobiota, ração, meios de cultivo, fungos em alimentos, micotoxinas, *Aspergillus*.



## ABSTRACT

The efficacy of potato dextrose agar acidified, dichloran rose bengala agar and dichloran glycerol 18% agar media were compared for isolation and enumeration of fungi present in 54 commercial packages of Brazilian dry, cereal based, pet foods (20 for cat and 34 for dog consumption) manufactured by 9 companies. Water activity of samples ranged between 0.45 and 0.82. Fungal presence was detected in 74% of samples. The survey showed presence of 23 genera and fungi identified as *Mycelia sterilia* and yeasts. No fungal species was recovered in 14 samples (8 for dog and 6 for cat). The forty positive samples showed low levels of contamination, ranged from  $10^1$  to  $10^3$  CFU/g. There was no correlation verified between water activity and level of fungal contamination. There was no statistical difference between the number of fungi isolated and media employed, even though DG18% agar showed better results in relationship to quantity and variety of isolated moulds. Comparison of results obtained through the three employed media, allows to observe that microorganisms recovered varies according to the employed media. The genus *Aspergillus* and particularly *Aspergillus niger* were the most frequent moulds recovered. Isolates belonging to potentially aflatoxins and ochratoxin A- producing species were evaluated using the agar plug-TLC screening method. Twenty percent of *A. flavus* were aflatoxin B1- producers; all isolates of *A. ochraceus* were ochratoxin A producers and all samples of *A. niger* being negatives for this toxin production. Fungal evaluation proceeded with 3 culture media showed that fungal detection is dependent of media chosen to make the analysis and corroborate importance to considerate the Aw of food and media to access the mycobiota present in the food.

**Key words:** mycobiota, pet food, food borne fungi, mycotoxin, *Aspergillus*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGOS CIENTÍFICOS</b>	<b>17</b>
2.1	Comparação de diferentes meios de cultivo para avaliação micológica de rações comerciais para cães e gatos.	18
2.2	Fungal contamination in Brazilian commercial pet food and toxigenic potential of some <i>Aspergillus</i> species	35
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>56</b>
	Anexo 1: Micotoxinas relacionadas a espécies potencialmente produtoras	57
	Anexo 2: Formulações dos meios de cultivos.	61
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Os alimentos para animais de estimação começaram a ser industrializados no Brasil em 1980, porém até 1994 sua produção era inexpressiva. A partir de então, a produção nacional dos mesmos vem apresentando um importante crescimento, tanto no volume quanto na variedade de produtos comercializados. A evolução do setor pode ser observada pelas estatísticas, com vendas da ordem de 222,8 mil toneladas de alimentos industrializados para cães e gatos no ano de 1994 e de 1,43 milhão de toneladas em 2004. Este crescimento é atribuído essencialmente à praticidade, maior facilidade de armazenamento, conscientização dos proprietários dos animais quanto à qualidade nutricional dos alimentos industrializados e maior disponibilidade e variedade de produtos (MAPA, 2002).

Por várias razões há uma tendência na indústria alimentícia de produzir alimentos com maior vida de prateleira. A principal técnica atualmente empregada para prevenir ou retardar a deterioração de alimentos é a aplicação de uma combinação de parâmetros, os quais podem atuar de maneira sinérgica para inibir ou retardar o desenvolvimento microbiano. Os parâmetros mais comumente empregados são redução da atividade de água ( $A_w$ ), redução de pH, tratamento térmico e uso de agentes antimicrobianos (CHIRIFE & FAVETTO, 1992; LEISTNER, 1992).

Dentre os alimentos para animais de estimação comercializados destacam-se as rações secas e extrusadas, nas quais o tratamento térmico durante o processamento é o principal parâmetro para redução da contaminação microbiológica e a redução da  $A_w$ , associado ao uso de substâncias antimicrobianas, o que restringe o posterior desenvolvimento de microrganismos na mesma.

As rações animais pertencem ao grupo de alimentos com umidade intermediária, caracterizando-se por: apresentar valores de  $A_w$  entre 0.60 e 0.85 e pH variável, receber tratamento térmico e poderem ser conservados a temperatura ambiente. Estes valores baixos de  $A_w$  são obtidos por retirada da água e/ou uso de aditivos como sais, açúcares, propilenoglicol, glicerol e sorbitol, e os níveis de pH são determinados principalmente pela adição de ácidos orgânicos (JAY, 1978).

A patente de Burgess para rações de cães e gatos (BURGESS & MELLENTIN, 1965) foi o primeiro grande passo para o avanço tecnológico na formulação de produtos de umidade intermediária. Basicamente, a patente descrevia a mistura dos principais ingredientes e

posterior extrusão da massa sob altas temperatura (60-150°C) e pressão (1.000 e 5.000 psi). Outros ingredientes como vitaminas e minerais eram adicionados posteriormente, de maneira que o produto final suprisse os requerimentos nutricionais dos animais. Desde seu desenvolvimento em 1965, inúmeras companhias desenvolveram produtos semelhantes para alimentação de cães e gatos, existindo atualmente mais de 40 patentes. A composição típica das rações para cães pode ser verificada na Tabela 1.

**Tabela 1: Composição típica para alimentos preparados para cães.**

<b>Ingrediente</b>	<b>Porcentagem</b>
Subprodutos de carne	32,0
Porções de soja	20,0
Farelo de trigo	12,0
Sacarose	12,0
Milho	12,0
Propilenoglicol	5,0
Farinha de osso	3,0
Gorduras animais	2,0
Sal	1,6
Sorbato de Potássio	0,3
Minerais, vitaminas e corantes	0,3

Nesses produtos a degradação bacteriana rápida está sob controle, porém a degradação fúngica ainda permanece problemática, principalmente pelo fato dos fungos serem microrganismos mais versáteis que as bactérias na superação de condições de estresse ambiental, como temperatura, baixos valores de pH e atividade de água no substrato (DE RUITER *et al.*, 1993).

Os fungos são capazes de crescer em todos os tipos de alimentos: cereais, carne, leite, frutos, vegetais, frutos secos, gordura e derivados destes. Há uma concordância geral que um aumento da atividade fúngica em alimentos pode afetar tanto sua composição química quanto

seu valor nutricional. O desenvolvimento fúngico pode resultar em diversas formas de deterioração: perda de sabor, aroma e nutrientes; formação de toxinas, descoloração, apodrecimento e formação de propágulos alérgicos e patogênicos (FILTENBORG *et al.*, 1996; BLÁHA *et al.*, 1990).

A ocorrência de alteração nas propriedades sensoriais dos alimentos é freqüentemente devido à síntese de exoenzimas durante a multiplicação fúngica. Um grande número de enzimas (como lipases, proteases e carboidrases) pode ser produzido, as quais provocam modificações no conteúdo de gordura e proteínas, além de aumentar o nível de ácidos graxos e de açúcares não redutores (BIGELIS apud FILTENBORG *et al.*, 1996).

Durante o desenvolvimento das espécies também podem ser produzidas substâncias voláteis (como dimetilsulfetos e 2-metil-isoborneol), as quais afetam a qualidade de alimentos e bebidas mesmo quando presentes em quantidades bastante reduzidas (ILLY & VIANI apud FILTENBORG *et al.*, 1996). Entretanto, o que modificou substancialmente a atitude do homem frente à contaminação fúngica dos alimentos, e deu uma nova dimensão à micologia alimentar, foi a descoberta de que muitos dos fungos contaminantes de alimentos são capazes de produzir uma grande variedade de substâncias tóxicas (FERNANDEZ PINTO & VAAMONDE, 1996). No Anexo 1 podem ser visualizadas as principais micotoxinas e respectivas espécies potencialmente produtoras.

Há muitos séculos tem-se conhecimento da toxicidade de algumas espécies fúngicas, porém somente a partir de 1850, ao relacionar-se a ingestão de centeio contaminado com *Claviceps purpurea* às manifestações clínicas de ergotismo, considerou-se a possibilidade de metabólitos fúngicos presentes em alimentos poderem apresentar riscos à saúde humana e animal (BEARDALL *et al.*, 1994). No entanto a era de pesquisas sobre micotoxinas somente teve início em 1960, como conseqüência direta de um surto ocorrido na Inglaterra, no qual mais de 100.000 perus morreram intoxicados. Estudos epidemiológicos revelaram que a síndrome estava relacionada à farinha de amendoim presente na ração das aves, e um ano depois se descobriu que um metabólito sintetizado pelo fungo *Aspergillus flavus* era o responsável pelo quadro tóxico da epidemia, denominando-se o mesmo de aflatoxina (SARGEANT *et al.*, 1961).

As micotoxinas são substâncias sintetizadas, sob determinadas condições, durante a multiplicação dos fungos. Algumas delas permanecem restritas ao micélio fúngico enquanto que a maior parte é secretada no substrato. Sabe-se que a maioria das micotoxinas é bastante resistente aos tratamentos químicos e físicos e, uma vez presentes nos alimentos, permanecem

inalteradas durante o processamento e estocagem (FILTENBORG *et al.*, 1996). Assim, pode-se inferir que a existência de contaminação, tanto por fungos quanto por micotoxinas, já na matéria prima que será utilizada no processamento dos produtos, pode contribuir para maior contaminação no produto final (NORTHOLT *et al.*, 1996).

As toxinas fúngicas diferem muito nas suas propriedades químicas, biológicas e toxicológicas, e possuem como efeitos tóxicos mais importantes o desencadeamento de diversos tipos de tumores e supressão imune (IARC, 1993; PETSKA & BONDY, 1994). Ao serem ingeridas podem se fixar aos tecidos, apesar da maior parte ser metabolizada e eliminada através de fluidos biológicos. Uma característica importante é sua capacidade de afetar órgãos específicos sem provocar alterações evidentes nos demais. Seus efeitos são conhecidos como micotoxicoses, cuja gravidade depende da toxicidade da micotoxina, do nível de exposição, idade, sexo e estado nutricional do animal, dos possíveis efeitos sinérgicos com outros compostos químicos e das condições de estresse ambiental a que os animais estão submetidos (PERAICA *et al.*, 1999).

Os efeitos adversos das toxinas fúngicas já estão bem documentadas em muitas espécies animais, principalmente em animais de produção. Entretanto poucas são as descrições de micotoxicoses em animais de companhia. Casos de micotoxicose natural por ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas, penitrem A, roquefortina e ocratoxinas já foram relatados em cães (KETTERER *et al.*, 1979; HOCKING *et al.*, 1988; PULS & LADYMAN, 1988; GAREIS *et al.*, apud BÖHM & RAZZAZI-FAZELI, 2005). Experimentalmente foram estudados os efeitos dos tricotecenos, patulina, ácido penicílico, moniliformina e ácido ciclopiazônico sobre cães e gatos (BÖHM & RAZZAZI-FAZELI, 2005).

O tipo e a quantidade de micotoxinas que podem estar presentes em um alimento dependem completamente dos fatores intrínsecos e dos parâmetros de processamento de um gênero alimentício em particular (FILTENBORG *et al.*, 1996). Como o número de diferentes micotoxinas que podem estar presentes em alimentos é muito maior que 100, é inviável a precisa detecção de cada uma delas separadamente. Métodos capazes de identificar fungos em alimentos podem ser mais úteis para a avaliação dos possíveis riscos acarretados por uma contaminação fúngica, do que a avaliação individual de cada micotoxina (DE RUITER *et al.*, 1993).

Cabe destacar que a presença de fungos toxinogênicos não indica necessariamente a produção de micotoxinas, pois são vários os fatores que determinam sua síntese. Tampouco a ausência de espécies fúngicas garante a inexistência de micotoxinas, já que estas podem

persistir por longos períodos, que vão desde o crescimento vegetativo até tornarem-se inviáveis. Entretanto, caso a história de um determinado alimento seja conhecida, como  $A_w$ , tempo de estocagem a temperaturas conhecidas, é possível avaliar mais adequadamente o risco potencial para a saúde proporcionado pelo consumo deste (BEUCHAT, 1987).

Impulsionado pela utilização de parâmetros micotoxicológicos para a certificação de qualidade de alimentos, atualmente existe um melhor conhecimento do papel desempenhado pelos fungos na deterioração dos mesmos. Porém, somente nos últimos anos é que maiores progressos têm sido alcançados na prevenção da degradação causada por fungos, devido principalmente aos recentes acordos internacionais sobre métodos analíticos e taxonômicos para detecção e identificação de fungos (FILTENBORG *et al.*, 1996).

Um grande número de métodos têm sido desenvolvidos para a investigação de fungos em alimentos. Até recentemente os métodos eram baseados em meios bacteriológicos já conhecidos ou em meios utilizados em micologia médica, onde bactérias e fungos patogênicos crescem com elevada atividade de água, alta temperatura e baixa concentração de carboidratos. Por outro lado, para os típicos fungos de ocorrência em alimentos, os quais crescem em baixa atividade de água, temperaturas mais baixas e, freqüentemente, altas concentrações de carboidratos, aqueles meios mostraram-se inadequados (SAMSON *et al.*, 1996).

Tradicionalmente o ágar batata acidificado tem sido utilizado para quantificação geral de fungos; entretanto, este meio não apresenta uma fonte nutritiva adequada e pode inibir a recuperação de células injuriadas devido ao seu pH baixo (3,5). Os meios suplementados com antibióticos e tinturas, como o ágar dicloram rosa de bengala e cloranfenicol (KING *et al.*, 1979), surgiram como alternativa mais eficaz que os meios acidificados por serem: menos inibitórios as células injuriadas, mais efetivos na inibição do desenvolvimento bacteriano e produzirem menos freqüentemente precipitação de partículas de alimento, devido ao seu pH mais elevado (5-6). O dicloram e o corante rosa de bengala têm sido aplicados com sucesso no controle da velocidade de disseminação de espécies fúngicas, restringindo principalmente os zigomicetos de rápido crescimento (KING *et al.*, 1979). Posteriormente foram introduzidos meios com atividade de água reduzida, como o ágar dicloram glicerol 18% ( $A_w$  0,95) para quantificação geral de fungos moderadamente xerofílicos em alimentos com umidade intermediária. O devido meio permite a recuperação de todos os fungos, incluindo os de crescimento fastidioso, que em meios com  $A_w$  tradicional (0,99) poderiam ter seu

crescimento impedido pelo desenvolvimento rápido das outras espécies (HOCKING & PITT, 1980).

O conhecimento das espécies de fungos envolvidas na deterioração de alimentos permite otimizar as medidas preservativas e higiênicas a serem adotadas durante a produção de cada alimento onde métodos simples e específicos para a detecção e controle dos pontos críticos de contaminação na cadeia produtiva de alimentos poderão ser melhor empregados (FILTENBORG *et al.*, 1996).

Considerando que as rações para cães e gatos contêm nutrientes como cereais, vegetais, carnes, gorduras e suplementos vitamínicos e minerais, que podem se constituir em excelentes substratos para o crescimento fúngico. Neste contexto, a avaliação da micobiota presente permite inferir sobre a qualidade do produto e condições higiênicas do ambiente de processamento do mesmo.

Os objetivos do trabalho foram:

- Comparar a eficácia dos meios ágar batata acidificado, ágar dicloram rosa de bengala e cloranfenicol e ágar dicloram glicerol 18% para isolamento e quantificação de fungos presentes em rações comerciais secas para cães e gatos,
- Quantificar a atividade de água destes produtos,
- Identificar a micobiota encontrada, e
- Avaliar o potencial micotoxinogênico de algumas espécies selecionadas.



**2 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

## **2.1 Comparação de diferentes meios de cultivo para avaliação micológica de rações comerciais para cães e gatos.**

Trabalho a ser submetido para publicação no “Brazilian Journal of Food Microbiology”.

**TÍTULO: Comparação de diferentes meios de cultivo para avaliação micológica de rações comerciais para cães e gatos**

**AUTORES:** Marina Venturini Copetti<sup>1\*</sup>, Janio Morais Santurio<sup>2</sup>, Laerte Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Setor de Micologia, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

**ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:** Setor de Micologia, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. e-mail: [marinacopetti@yahoo.com.br](mailto:marinacopetti@yahoo.com.br)

Telefone: (00 55) 51- 3316 6964

## RESUMO

A eficácia dos meios ágar batata acidificado, ágar dicloram rosa de bengala e cloranfenicol e ágar dicloram glicerol 18% para isolamento e quantificação de fungos foi comparada a partir de 54 amostras de rações comerciais secas para cães e gatos (34 para cães e 20 para gatos). Em 74% das amostras foi detectada presença fúngica, com isolamento e identificação de 23 gêneros, além de isolados com micélio estéril e leveduras. O gênero *Aspergillus* e a espécie *Aspergillus niger* foram os mais freqüentemente isolados, independentemente do meio de cultivo utilizado. Quarenta (40) amostras apresentaram baixos níveis de contaminação, com contagens variando entre  $10^1$  e  $10^3$  UFC/g. Não se observou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o número de fungos isolados nos diferentes meios de cultivo, devido ao alto desvio padrão encontrado nas diferentes amostras. Entretanto, é importante registrar que o DG18 foi o meio que apresentou melhores resultados considerando a quantidade e a variedade de fungos isolados. Ao se comparar os resultados obtidos com diferentes meios, observa-se que a microbiota encontrada pode variar conforme o meio de cultivo selecionado. Logo, a utilização de meios específicos, selecionados conforme as características de cada alimento a ser avaliado, permite evidenciar melhor a presença de microrganismos deletérios ao mesmo.

**Palavras chaves:** Microbiota, ração, *Aspergillus*, meios de cultivo, fungos em alimento,.

## INTRODUÇÃO

As análises microbiológicas dos gêneros alimentícios têm destacado valor para garantia de produtos industrializados de qualidade. A quantificação de leveduras e fungos filamentosos geralmente envolve a inoculação da amostra em meios de cultivo sólidos através de plaqueamento em superfície ou em profundidade [3]. De modo geral os meios de cultura para avaliação fúngica são altamente seletivos, suprimindo contaminações bacterianas [16] e limitando o crescimento e disseminação das colônias fúngicas [4]. Infelizmente não se dispõe de um único meio que seja satisfatório para detecção ou quantificação de leveduras e fungos filamentosos em todos os tipos de alimentos.

Tradicionalmente o ágar batata acidificado tem sido utilizado para quantificação geral de fungos; entretanto, este meio não apresenta uma fonte nutritiva adequada e pode inibir a recuperação de células injuriadas devido ao seu baixo pH (3,5) [14]. Os meios suplementados com antibióticos e tinturas, como o ágar dicloram rosa de bengala e cloranfenicol [10], surgiram como alternativa mais eficaz que os meios acidificados por serem menos inibitórios a células injuriadas, mais efetivos na inibição do desenvolvimento bacteriano e produzem menor precipitação de partículas de alimento, devido ao pH mais elevado (5-6) [14]. Rotineiramente o dicloram e o corante rosa de bengala têm sido aplicados com sucesso no controle da velocidade de disseminação de espécies fúngicas, restringindo, principalmente, os zigomicetos de rápido crescimento [10]. Posteriormente, introduziram-se meios com atividade de água ( $A_w$ ) reduzida, como o dicloram glicerol 18% ( $A_w$  0,95) para quantificação geral de fungos moderadamente xerofílicos, daqueles com crescimento fastidioso, os quais em meios com  $A_w$  tradicional ( $A_w$  0,99) poderiam ter seu crescimento impedido devido ao desenvolvimento rápido das outras espécies [9].

Neste trabalho foi avaliada a eficácia destes 3 diferentes meios de cultura para quantificação e isolamento de fungos a partir de amostras de rações comerciais para cães e gatos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Coleta de Amostras**

Cinquenta e quatro pacotes de diferentes rações secas (34 destinadas ao consumo de cães e 20 para gatos) produzidas por 9 diferentes empresas foram aleatoriamente adquiridas em supermercados e casas agropecuárias na cidade de Santa Maria em janeiro de 2004. Após a coleta, as amostras foram identificadas por códigos e armazenadas conforme a especificação no rótulo até o momento da análise.

### **Avaliação da contaminação fúngica das amostras**

Para quantificação e identificação fúngica ao nível de gêneros utilizou-se ágar batata acidificado (PDA), ágar dicloram rosa de bengala com cloranfenicol (DRBC) e ágar dicloram glicerol 18% (DG18). As amostras foram processadas segundo metodologia recomendada por Samson *et al.* (1996) para detecção e isolamento de fungos presentes em alimentos [14].

Retirou-se 10g de cada amostra, reidratou-se em 90 mL de solução de água peptonada a 0,1% por aproximadamente 1 hora, homogeneizou-se o material obtendo-se assim a diluição  $10^{-1}$  e preparou-se uma diluição  $10^{-2}$ .

Para inoculação utilizaram-se as técnicas de plaqueamento em superfície e profundidade com as diluições da amostra. Para a técnica de semeadura em superfície inocularam-se alíquotas de 0,1mL das diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  em placas contendo meio já solidificado, espalhando-se o inóculo na superfície do mesmo. Para semeadura em

profundidade inoculou-se 1mL da diluição  $10^{-1}$  em água peptonada e, a seguir, adicionou-se 15-20mL de meio de cultivo a 45-50°C, misturando-se adequadamente.

Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, sob condições de esterilidade.

As placas foram incubadas a 28°C durante 5 dias; a seguir, examinadas para presença de leveduras e fungos filamentosos, selecionando-se para quantificação as culturas contendo 10-100 colônias; os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC/g). Em amostras que resultaram em cultivos contendo menos que 10 UFC/g na menor diluição testada também foram contabilizadas.

Procedeu-se a identificação taxonômica dos gêneros, a partir dos meios de isolamento, conforme características macro e microscópicas das colônias, utilizando-se chaves de identificação apropriadas [2, 13]. Para a identificação das espécies, realizaram-se subcultivos em tubos contendo ágar batata e posteriormente seguiram-se esquemas de cultivo e chaves específicas para cada gênero [13]. As colônias que, após serem subcultivadas durante 21 dias em agar batata, não produziram propágulos diferenciados foram consideradas como *Mycelia sterilia*.

A frequência de isolamento (%) dos gêneros foi calculada como:

$$= (n^{\circ} \text{ de amostras com presença do gênero} / n^{\circ} \text{ total de amostras}) \times 100$$

### **Análise estatística**

As contagens de fungos foram analisadas através de ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, através do programa “Statistical Analysis System”.

## RESULTADOS

As análises permitiram a classificação de 23 gêneros, além da detecção de fungos identificados apenas como *Mycelia sterilia* e leveduras em 40 (74%) das 54 amostras de rações (26 para cães e 14 para gatos). Em 14 amostras de ração (8 para cães e 6 para gatos) não se detectou presença fúngica.

A frequência de isolamento fúngico nos diferentes meios pode ser visualizada na Figura 1. O gênero *Aspergillus* foi o mais frequentemente isolado nas amostras, independentemente do meio de cultivo observado. Comparativamente, o meio PDA foi menos eficaz, não proporcionando o isolamento de diversos gêneros, tais como *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Olyptrichum* e *Phoma*.

Na Tabela 1 se observam as frequências de ocorrência de espécies do gênero *Aspergillus* e de seus teleomorfos. A utilização do meio DG18 possibilitou o isolamento de 18 diferentes espécies, com maior ocorrência de *A. niger* (40,7% do total das amostras). As espécies *A. penicillioides* e *E. rubrum* somente foram isolados em DG18. Já com o meio de PDA foi possível isolar apenas 14 espécies distintas de *Aspergillus*, também com predominância de *A. niger*. O emprego do meio DRBC proporcionou o de 13 espécies, com maior frequência de *A. niger* e *A. candidus*, ambos presentes em 18,5% das rações.

Das 40 amostras positivas, 39 apresentaram níveis de contaminação com contagens variando entre  $10^1$  e  $10^2$  UFC/g (Tabela 2). Somente uma amostra apresentou nível de contaminação de  $10^3$ UC/g com microbiota composta exclusivamente por leveduras. Não se observou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o número de fungos isolados nos diferentes meios de cultivo, devido ao alto desvio padrão encontrado nas diferentes amostras.



## DISCUSSÃO

Leveduras e fungos filamentosos encontram-se amplamente distribuídos no solo, água e ar. Conseqüentemente, materiais não processados de origem vegetal ou animal encontram-se contaminados pelos mesmos quando chegam na plataforma industrial. Boas práticas de processamento podem originar produtos livres de fungos ou reduzir suas populações [17]. Entretanto, ao fornecer-se tempo suficiente, estes microrganismos sobreviventes podem se multiplicar e eventualmente deteriorar o produto. A detecção e quantificação de células viáveis de fungos filamentosos e leveduras em produtos processados ou não, é um requisito parcial de programas de controle de qualidade, e podem ser utilizados para monitorar a efetividade das práticas de sanitização durante o período de pós-colheita de grãos, abate dos animais, processamento e distribuição de alimentos [3].

Na avaliação da micobiota presente em rações para animais de companhia, realizada por Scudamore *et al.* (1997), utilizando ágar malte e DG18, encontrou-se *Aspergillus*, *Eurotium* e *Penicillium* como gêneros predominantes entre 10 diferentes gêneros isolados [15]. Estes dados concordam com os resultados encontrados neste estudo com análise através de DG18.

Observando-se a freqüência de isolamento fúngico com os meios de DRBC e PDA verificou-se menor presença do gênero *Eurotium* do que a verificada no meio DG18. Em estudos similares conduzidos por Martins *et al.* (2003) utilizando DRBC [12] e por Bueno *et al.* (2001) com PDA [5], encontrou-se, respectivamente, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor* e *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Mucor* como os 3 gêneros mais prevalentes. A presença de *Eurotium* spp. não foi relatada nestes estudos.

O gênero *Eurotium*, por requerer  $A_w$  mínima para crescimento próxima a 0,70, possui importância na deterioração de alimentos com  $A_w$  reduzida, como a encontrada nas rações comerciais. Em meios de cultivo com  $A_w$  elevada (0,99), como DRBC e PDA, o gênero

*Eurotium* apresenta crescimento lento e pode ser sobreposto por espécies de crescimento rápido, prejudicando sua recuperação em cultivo. Assim, para análise de alimentos com baixa Aw, recomenda-se a utilização de meios com Aw reduzida (0,95), como o DG18 [8].

Todos os fungos microrganismos relatados nesta pesquisa já foram isolados em alimentos. Os que apresentaram ocorrência mais freqüente pertencem ao grupo de fungos moderadamente xerofílicos, os quais são capazes de se desenvolver em Aw inferiores a 0,85, estando estes comumente associados a alimentos de umidade intermediária, como as rações para animais [8].

A maioria dos fungos xerotolerantes pertence aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, ou são as formas perfeitas do *Aspergillus*, como *Eurotium* e *Emericella*. Quando presentes, o crescimento destes microrganismos pode causar a deterioração de alimentos. Um dos principais fatores de controle sobre o desenvolvimento destes em alimentos é a redução da água disponível no substrato, uma vez que é rara a deterioração microbiológica quando os níveis de Aw forem inferiores a 0,65 [1].

Além de importantes deteriorantes de alimentos, a grande maioria das espécies de *Aspergillus* e teleomorfos relacionados isolados nesta pesquisa é potencialmente produtora de metabólitos tóxicos. Entretanto, a Aw mínima requerida para síntese de toxinas é superior à mínima requerida para multiplicação fúngica [13].

O *A. niger*, espécie potencialmente produtora de ocratoxina A [7], também foi a espécie mais freqüente nas rações, segundo resultados obtidos em Portugal [12].

O isolamento de *A. penicillioides* em alimentos é raro, principalmente por esta espécie xerofílica não crescer, ou se desenvolver muito lentamente, nos meios com alta Aw comumente utilizados para isolamento de fungos em alimentos. Seu crescimento é considerado ótimo em meios com Aw 0,91-0,93 [13].

A contagem fúngica é um indicador da qualidade das rações, e não deve exceder  $10^5$  UFC/g em matérias primas ou numa ração de boa qualidade microbiológica [6]. Os baixos níveis de contaminação encontrados em amostras de ração para cães e gatos já foram relatados por outros pesquisadores [12, 15]. Estes baixos níveis se devem principalmente as altas temperaturas ( $120^{\circ}\text{C}$ ) a que os ingredientes são submetidos durante a extrusão, no processo de fabricação da ração. A micobiota final nos produtos, provavelmente, se deve a uma recontaminação destes, ocorrida no ambiente de processamento, principalmente pelos propágulos fúngicos presentes nas partículas de farinha dos cereais suspensas no ar e em menor proporção por uma resistência ao tratamento térmico [17].

O controle sobre o desenvolvimento fúngico durante a estocagem dos produtos é alcançado principalmente através da baixa  $A_w$  do produto final [5]. A média dos valores de  $A_w$  presentes nas amostras avaliadas neste estudo foi 0,61 (dados não apresentados). Entretanto, os microrganismos podem permanecer viáveis por períodos de tempo relativamente longos, e o armazenamento das rações em condições inadequadas, ou seja, em ambientes com alta umidade e temperaturas, pode propiciar condições favoráveis para que os propágulos fúngicos se desenvolvam e sintetizem diversas toxinas [15].

O uso de inibidores, como sulfato de cobre e ácidos orgânicos, na formulação de muitas rações para cães e gatos também pode contribuir para a inibição do desenvolvimento fúngico [11].

Apesar de não se ter encontrado diferença significativa na eficiência dos diferentes meios, o DG18 foi o meio que apresentou melhores resultados tanto na quantidade quanto na variedade de fungos isolados a partir das rações avaliadas.

Comparando-se os resultados obtidos neste estudo com diferentes meios observa-se que a micobiota encontrada pode variar conforme meio de cultivo utilizado. Conclui-se desta forma que, a utilização de meios específicos, selecionados conforme as características de cada

alimento, permite evidenciar melhor a presença de microrganismos deletérios a estes alimentos.

Tabela 1: Freqüência de isolamentos de *Aspergillus* e seus teleomorfos a partir de rações animais, utilizando-se diferentes meios de cultivo.

	Nº de amostras com a espécie		
	(Freqüência %)		
	DG18	DRBC	PDA
<b><i>Aspergillus</i> e Teleomorfos</b>	<b>37 (68,52)</b>	<b>31 (57,41)</b>	<b>29 (53,65)</b>
<i>Aspergillus niger</i>	22 (40,74)	10 (18,52)	16 (29,6)
<i>A. candidus</i>	20 (37,04)	10 (18,52)	4 (7,4)
<i>A. fumigatus</i>	11 (20,37)	5 (9,27)	6 (11,12)
<i>A. flavus</i>	10 (18,52)	6 (11,12)	6 (11,12)
<i>A. terreus</i>	9 (16,67)	6 (11,12)	6 (11,12)
<i>A. versicolor</i>	7 (12,96)	5 (9,27)	1 (1,85)
<i>A. sclerotiorum</i>	3 (5,56)	0	2 (3,70)
<i>A. ochraceus</i>	3 (5,56)	1 (1,85)	1 (1,85)
<i>A. oryzae</i>	2 (3,70)	1 (1,85)	2 (3,70)
<i>A. penicillioides</i>	2 (3,70)	0	0
<i>A. wentii</i>	2 (3,70)	0	2 (3,70)
<i>A. sindowii</i>	1 (1,85)	0	1 (1,85)
<i>A. ustus</i>	1 (1,85)	1 (1,85)	0
<i>Emericella nidulans</i>	7 (12,96)	4 (7,4)	1 (1,85)
<i>Eurotium amstelodami</i>	13 (24,07)	4 (7,4)	4 (7,4)

<i>E. repens</i>	11 (18,52)	2 (3,70)	2 (3,70)
<i>E. chevalieri</i>	3 (5,56)	2 (3,70)	2 (3,70)
<i>E. rubrum</i>	1 (1,85)	0	0

---

DG18: Ágar dicloram glicerol 18%

DRBC: Ágar dicloram rosa de bengala e cloranfenicol

PDA: Ágar batata acidificado

Tabela 2: Valores médios e variação da contagem total de fungos (UFC/g) obtidos pelos diferentes meios de cultivo a partir de rações para cães e gatos de diferentes empresas.

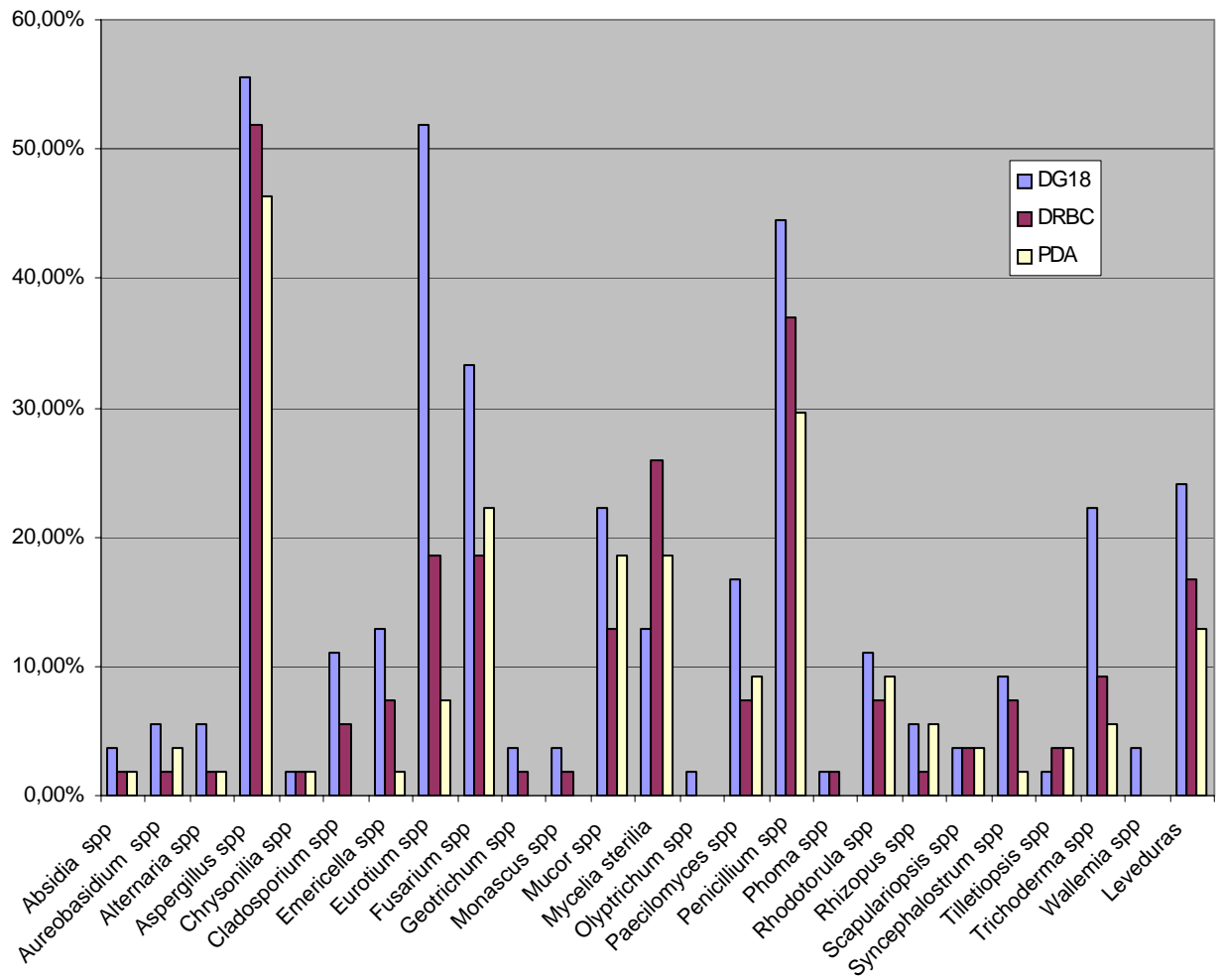
Empresa	n	DG18		DRBC		PDA	
		Média	Varição	Média	Varição	Média	Varição
1	8	3,8	0 - 1,6x10 <sup>1</sup>	1,7	0 - 10 <sup>1</sup>	2,1	0 - 10 <sup>1</sup>
2	19	9,4	0 - 1,2x10 <sup>2</sup>	5,5	0 - 5,3x10 <sup>1</sup>	6,2	0 - 4,3x10 <sup>1</sup>
3	9	45,9	0 - 9x10 <sup>1</sup>	41,5	3 - 8x10 <sup>1</sup>	32,6	3-9x10 <sup>1</sup>
4	3	315,6	10 <sup>1</sup> - 4,8x10 <sup>2</sup>	275,6	4 10 <sup>1</sup> - 4,5x10 <sup>2</sup>	222,2	6,3x10 <sup>1</sup> - 3,3x10 <sup>2</sup>
5	7	97,6	10 <sup>1</sup> - 4,6x10 <sup>2</sup>	106,7	2 10 <sup>1</sup> - 4,9x10 <sup>2</sup>	86,7	0 - 4,6x10 <sup>2</sup>
6	1	250,0	2,5x10 <sup>2</sup>	146,7	1,5x10 <sup>2</sup>	126,7	1,3x10 <sup>2</sup>
7	2	156,7	2,3x10 <sup>1</sup> - 2,9x10 <sup>2</sup>	136,7	2,3x10 <sup>1</sup> - 2,5x10 <sup>2</sup>	136,7	3,3x10 <sup>1</sup> - 2,4x10 <sup>2</sup>
8	4	1020,8	10 <sup>1</sup> - 3,5x10 <sup>3</sup>	1011,7	1,3x10 <sup>1</sup> - 3,6x10 <sup>3</sup>	966,7	10 <sup>1</sup> - 3,5x10 <sup>3</sup>
9	1	330,0	3,3x10 <sup>2</sup>	203,3	2x10 <sup>2</sup>	63,3	6,3x10 <sup>1</sup>
<b>Total</b>	<b>54</b>	<b>133,9</b>	<b>0- 3,5x10<sup>3</sup></b>	<b>124,7</b>	<b>0 - 3,6x10<sup>3</sup></b>	<b>111,7</b>	<b>0 - 3,5x10<sup>3</sup></b>

DG18: Ágar dicloram glicerol 18%

DRBC: Ágar dicloram rosa de bengala e cloranfenicol

PDA: Ágar batata acidificado

Figura 1: Freqüência de isolamento fúngico a partir de ração para cães e gatos em diferentes meios de cultivo.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abellana, M.; Benedi, J.; Sanchos, V.; Ramos, A.J. Water activity and temperatura effects on germination of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* e *E. herbariorum* isolates from bakery products. *J. Appl. Microbiol.* 87, 371-380, 1999.
2. Barnett, H.L., Hunter, B., (1998). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. The American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul , Minesota. 218 p.
3. Beuchat, L.R. Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. *International J. Food Microbiol.* 17, 145 –158, 1992.
4. Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Castella, G.; Cabañes, F.J. Dyes as fungal inhibitors: effects on colony enumeration. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 578-582, 1995.
5. Bueno, D.J.; Silva, J.O.; Oliver, G. Mycoflora in commercial pet foods. *J. Food Prot.* 64 (5), 741-743, 2001.
6. Chelskowski, J. Mycological quality o mixed feeds and ingredients. *In: Chelskowski, J. (ed), Cereal grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage.* Elsevier, Amsterdam, 1991, p. 217-227.
7. Dalcerro, A.; Magnoli, C.; Hallak, C.; Chiacchiera, S.M.; Palacio, G.; Rosas, C.A.R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxins by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Addit. Contam.*, 19, 1065-1072, 2002.
8. Hocking, A.D.; Pitt, J.I. Media and methods for detection and enumeration of microorganisms with consideration of water activity requirements. *In: Rockland, L.D., Beuchat, L.R. (Eds.) Water Activity: Theory and applications to food.* Marcel Dekker, Inc, New York, 1987, p. 153-172.

9. Hocking, A.D.; Pitt, J.I. Dichloran glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 488-492, 1980.
10. King, A.D.; Hocking, A.D.; Pitt, J.I. Dichloran rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 959-964, 1979.
11. Maia, P.P.; Siqueira, M.E.P.B. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in some Brazilian pet foods. *Food Addit. Contam.* 19 (12), 1180-1183, 2002.
12. Martins, M.L.; Martins, H.M.; Bernardo, F. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, 98 (548), 179-183, 2003.
13. Pitt, J.I.; Hocking, A.D. *Fungi and food spoilage*. 2nd edition. Division of Food Research, Sydney, 1997, 593 pp.
14. Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C.; Filteborg, O. Methods for the detection and isolation of food-borne fungi. In: Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filteborg *Introduction to food-borne fungi*. CBS, The Netherlands, 1996 5<sup>th</sup> ed, p. 261-269.
15. Scudamore, K.A.; Hetmanski, M.T.; Nawaz, S., Naylor, J.; Rainbird, S. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. *Food Addit. Contam.*, 14 (2), 175-186, 1997.
16. Skaar, I.; Stewing, H. Malt-Yeast Extract- Sucrose Agar: A suitable medium to enumeration and isolation of fungi from silages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3614-3619, 1996.
17. Weidenböcker, M.; Wieczorek, C.; Appel, S.; Kunz, B. Whole wheat and white wheat flour- the mycobiota and potential mycotoxins. *Food Microbiol.*, 17, 103-107, 2000.

## **2.2 Fungal contamination in Brazilian commercial pet food and toxigenic potential of some *Aspergillus* species**

Trabalho a ser submetido para publicação no “International Journal of Food Microbiology”.

**TITLE: Fungal contamination in Brazilian commercial pet food and toxigenic potential of some *Aspergillus* species**

**AUTHORS: Marina Venturini Copetti<sup>1\*</sup>, Janio Morais Santurio<sup>2</sup>, Laerte Ferreiro<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Setor de Micologia, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

**ADDRESS TO CORRESPONDENCE: Setor de Micologia, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. e-mail: [marinacopetti@yahoo.com.br](mailto:marinacopetti@yahoo.com.br)**

Phone number: 00 55 51- 3316 6964

## ABSTRACT

Evaluation of fungal contamination present in 54 commercial packages of Brazilian dry, cereal based pet foods (20 for cat and 34 for dog consumption) was performed using Dichloran Glycerol 18%. Fungi were detected in 74% of samples. No fungal species were recovered in 14 samples (8 for dog and 6 for cat consumption). All positive samples showed low levels of contamination, ranging from  $10^1$  to  $10^3$  CFU/g. Water activity of samples was measured and ranged between 0.45 and 0.82. There was no correlation verified between water activity and level of fungal contamination. The survey allowed the classification of 23 genera and identification of some classified only as *Mycelia sterilia* or yeasts. *Aspergillus* spp. were the most frequent, occurring in 55.6% of the overall mycobiota, followed by their teleomorphic state *Eurotium* spp. (51.8%), *Penicillium* spp. (44.4%), and *Fusarium* spp. (33.3%). Among *Aspergillus* and its teleomorphs, 18 species were identified, being *Aspergillus niger* and *A. candidus* the most frequent, present in respectively 41% and 37% of samples. Fungi belonging to potentially aflatoxins and ochratoxin A- producing species were evaluated using the agar plug-TLC screening method. Twenty percent of *A. flavus* isolated were Aflatoxin B1-producer; all isolates of *A. ochraceus* were ochratoxin producers and all samples of *A. niger* being OTA negative producers. Among 16 isolated species of *Penicillium*, the most frequent was *Penicillium citrinum*.

**Key words:** mycobiota, pet food, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium*, aflatoxin, ochratoxin, mycotoxin producing-fungi, Aw.

## INTRODUCTION

Moulds are able to grow on all kinds of food: cereals, meat, milk, fruit, vegetables, fats and products of these. There is general agreement that an increased microbial activity in feeds may affect both their chemical composition and nutritional value. The mould growth may result in several kinds of food-spoilage: off-flavours, toxins, discoloration, rotting and formation of pathogenic or allergic propagules (Bláha *et al.*, 1990; Filtenborg *et al.*, 1996).

Deterioration of sensorial properties is often due to the synthesis of a vast number of exoenzymes during mould growth (Filtenborg *et al.*, 1996). However, besides problems with spoilage, growth of moulds on foods has taken on new significance since the discovery of aflatoxins in the early 1960s. Since that time, researchers have isolated and characterized hundreds of other moulds metabolites that can cause toxic effect in human and animals (Beuchat, 1987).

Commercial pet food are extensively used to feed dogs and cats in Brazil, usually constituting the major part of the diet for these animals. Dog and cat food are prepared with vegetables and/or meat, cereal grains, fat, vitamins and minerals, ingredients that may act as substrate to fungi growth. Evaluations of mycobiota associated to commercial pet foods provide data about food quality, hygienic conditions on manufacture environment, likewise permit estimation of intoxication risk to which pets are daily exposed. The purpose of this study was evaluate the water activity and fungal contamination in commercial pet food, verify genera and identify *Aspergillus* species present in the samples, likewise capability of some species to produce aflatoxins and ochratoxin A.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Samples**

54 commercial packages of different trademarks of dry, cereal based pet foods, 20 for cat and 34 for dog consumption, were randomly purchased from supermarkets and grocery multiples in January 2004. These primary samples were identified and stored according pack instruction until be analyzed.

### **Water activity (Aw) of pet food**

Water activity was directly quantified in TESTO 650 apparatus, in duplicate analyses.

### **Mycobiota determination**

Enumeration and identification at genus level was done, in triplicate, in dichloran glycerol 18% agar (DG18%), according to Hocking & Pitt (1987) recommendations.

Ten grams of each sample were taken directly from the bags that were opened in sterilized conditions, re-hydrated in 90 ml of 0.1% peptone water solution for about 1 hour, homogenized and a ten-fold dilution was prepared. Pour-plate technique was used to quantify fungi at  $10^{-1}$  dilution. Triplicate aliquots of 1mL from initial sample suspension were pipetted into Petri dishes and 20 mL of each medium at 45-50°C was added and mixed. To evaluate the  $10^{-1}$  and  $10^{-2}$  dilutions, surface-spread method was applied. Triplicate aliquots of 0.1mL from serial dilution were pipetted onto agar plates and spread.

Plates were incubated in darkness at 28°C for 5 to 7 days under normal atmosphere and examined for filamentous fungi and yeasts. Total moulds and yeasts presents were counted as colony forming units per gram of sample (CFU/g).

Taxonomic identification at genus level was made according to microscopic and macroscopic features using appropriate key (Barnett & Hunter, 1998; Pitt & Hocking, 1997).

Those colonies that were nonsporulating after a 21-day incubation period were considered *Mycelia sterilia*.

The isolation frequency (FR) of genera was calculated as follow:

Frequency (%) = (number of samples with occurrence of a genus/ total number of samples) x 100

To access isolation FR of species, the number of samples with occurrence of a genus should be substituted by the number of samples with occurrence of a determinate specie.

### **Fungal isolation and identification**

Fungal colonies identified as *Aspergillus* and *Penicillium* were subcultured in potato dextrose agar and *Fusarium* in carnation leaf agar (CLA) for later identification of species. Taxonomic identification of different fungi was realized through macroscopic and microscopic examination, following the cultural schemes proposed in each key (Nelson *et al.*, 1983; Pitt & Hocking, 1997; Pitt, 2000).

### **Aflatoxins (AFs) and Ochratoxin A (OTA)-producing ability**

The isolates belonging to recognized AFs e OTA- producing species were evaluated using an agar plug-Thin Layer Chromatography (TLC) screening method (Filteborg *et al.*, 1983). Briefly, the isolates were grown in plates containing yeast sucrose agar (YES) at 25°C for 14 days. One agar plug was removed from the center of the colony, extracted with a drop of methanol : chloroform (1:1) solution and placed in a TLC plate. OTA e AFs were verified on the basis of respective standards (Sigma Chemical – E.U.A.)



## RESULTS

The Aw of foods ranged from 0.507 to 0.802 for dog foods and 0.453 to 0.680 for cats (Table 1). There was no correlation verified between water activity and level of fungal contamination.

No fungal species were recovered in 14 samples (8 from dog and 6 from cat food). Most positive samples showed low levels of contamination, ranged from  $10^1$  to  $10^2$  CFU/g. Only one sample presented a higher level of contamination, with counts of  $10^3$  CFU/g, with mycobiota composed exclusively by yeasts.

The occurrence of fungi genera was defined as the percentage of samples in which each fungus was present. Survey of 54 samples of dry pet food showed presence of 23 genera and fungi classified as *Mycelia sterilia* and yeasts (Figure 1).

*Aspergillus* was the most frequent genus of the mycobiota, occurring in 55.6% of samples, followed by their teleomorfic state *Eurotium* spp. (51.8%), *Penicillium* spp. (44.4%), and *Fusarium* spp. (33.3%), among other genera isolated in a minor percentage of samples. These four most frequent genera are among the most important fungi related to food spoilage and mycotoxin synthesis. Due to their importance, they were classified at species level.

From the *Aspergillus* genus and their teleomorphs, 18 species were identified. *Aspergillus niger* (41%) and *A. candidus* (37%) were the most frequent in the samples evaluated (Table2).

In the *Penicillium* genus, also 16 species were identified and the predominant specie was *Penicillium citrinum* (15%). No teleomorphic states were isolated (Table2).

From the *Fusarium* genus only two species *Fusarium proliferatum* and *F. verticillioides* were recovered in 26 and 11% of all samples, respectively.

A total of 10 isolates of *A. flavus* were screened for ability to produce AFs, 2 isolates (20%), were Aflatoxin B1- producer.

To access ability to produce OTA, a total of 3 and 22 isolates belonging to *A. ochraceus* and *A. niger* respectively, were selected. All isolates of *A. ochraceus* and no one of *A. niger* were detected as OTA producers through the analytical method adopted in this survey.

## DISCUSSION

The Aw of a food have a major influence on the type of microbiota capable of growing in a particular food and cause spoilage. Because food spoilage fungi can grow over a wide Aw range (0.999-0.61), the choice of medium is very important, as it will determine the types of fungi isolated (Hocking & Pitt, 1987). DG18% is a media formulated for enumerating moderately xerophilic fungi in intermediate and low moisture food, such dry pet foods, which presented Aw ranged between 0.45 and 0.82 in the samples evaluated.

The low level of contamination found in the samples evaluated should be attributed to the heating treatment of ingredients during the manufacturing process, especially at extrusion when temperature generally reaches 120°C. Although molds are usually destroyed in the manufacturing process, a non-proper processing may enable their survival in the feed. Furthermore, a recontamination in the manufactured product by fungi can occur in the environment of processing establishment (Bullerman & Hartung, 1973). The control on microorganisms growth on pet food during storage period is achieved mainly through low Aw concentration in the final product (Bueno *et al.*, 2001). However, microorganism may maintain viability for relatively long periods of time, and storage in deficient conditions, where feed are submitted to high humidity and temperature, may propitiate adequate conditions to conidia germination, growth and toxin synthesis (Scudamore *et al.*, 1997). The use of inhibitors such copper sulfate and organic acids as ingredients in the formulation of many pet foods may contribute to the inhibition of fungal growth (Maia & Siqueira, 2002).

Our results showed *Aspergillus*, *Eurotium* and *Penicillium* as more prevalent among 23 genera isolated in Brazilian pet food. A survey carried out in United Kingdom by Scudamore *et al.* (1997) which evaluated mycobiota in samples of pet food processed on receipt and after storage in modified conditions at 20 and 25% moisture content, using 2% malt + chloramphenicol (MC) and DG18% to fungal enumeration, also found *Aspergillus* sp., *Eurotium* sp. and *Penicillium* sp. as most predominant among 10 genera found on receipt of samples. Bueno *et al.* (2001) analyzing samples of pet food from Argentina in agar potato dextrose + chloramphenicol (PDAC) found 10 genera, with *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. and *Mucor* sp. as most prevalent. In a study carried out in Portugal using agar dichloran rose of bengal and chloramphenicol (DRBC) medium to access pet food mycobiota, Martins *et al.* (2003) only reported 3 genera in the samples evaluated: *Aspergillus*, *Penicillium* and *Mucor*. Our data of mycobiota most prevalent is in accordance with results presented by Scudamore *et al.* (1997), which used the same media. We infer that, besides regional differences, the kind of genera accessed can be greatly influenced by the culture media chosen to perform the survey, e.g. species with fast development can overgrow others, specially xerophilic fungi that grow very slowly in media with high  $A_w$ , as PDAC, DRBC and MC, making difficult their isolation. The use of inhibitors of growth like dichloran and rose of bengal will control the spread of some fungi, specially mucorales, and facilitate enumeration and isolation of species present in the samples.

Many of the fungi isolated from pet food may be associated with mycoses or allergenic responses; others are reported as capable of producing mycotoxins, while others are associated with food spoilage.

Numerous mycotoxins theoretically could be synthesized by the fungal species found in this survey (Table 3), however a whole of environmental and fungal factors acting together will determine synthesis of secondary metabolites. The presence of toxigenic fungi does not

indicate mycotoxin presence, but the isolation of determinate fungi implicates a potential risk for dog and cat health (Bueno *et al.*, 2001).

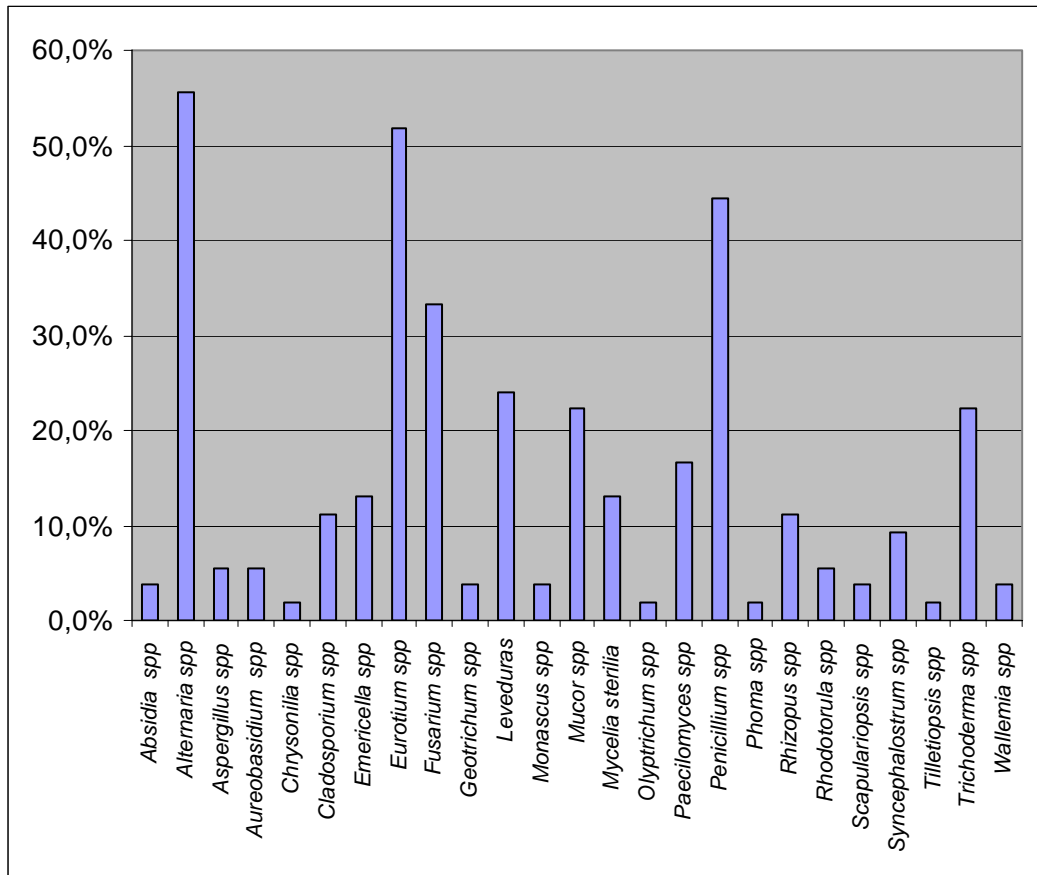
*A. flavus*, an important aflatoxin producer, was isolated in high percentage in all studies evaluating mycobiota in pet food (Scudamore *et al.*, 1997; Bueno *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2003). In this survey it was present in 18.5% samples, and 20% of these were aflatoxin producer. Occurrence of mycotoxins in the samples was not investigated in this study, but presence of aflatoxins in Brazilian pet food has already been reported by Maya & Siqueira (2002).

Dogs and cats are extremely sensitive to aflatoxin, and the liver is the primary target organ. The clinical signs include hepatitis, vomiting, depression and anorexia, followed by dehydration, somnolence and jaundice. Sudden death can occur in acute cases of aflatoxicosis (Bohm & Razzazi-Fazeli, 2005).

Besides aflatoxin, occurrence of ochratoxin A, fumonisins and deoxinivalenol were also reported in this kind of feed (Scudamore *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 2003). *A. niger*, the most prevalent specie found in this survey, likewise *A. ochraceus*, *A. carbonarius* and *P. verrucosum*, are potentially ochratoxin A producer. The origin of ochratoxin A in cool and temperate climates is generally attributed to *P. verrucosum*, whereas in warm temperate and tropical zones it is now commonly associated with *A. ochraceus* and the black aspergilli (Pitt & Hocking 1997). In this study, capability to ochratoxin A production was only detected in isolates of *A. ochraceus*. However, in study conducted by Dalcerro *et al.* (2002) to evaluate capability of ochratoxin A synthesis by black aspergilli isolated from animal feed, testing different detection methods, TLC methods for fast screening of ochratoxin A were not sensitive enough to detected this toxin in any of the black *Aspergillus*, whereas in HPLC 46% of these strains produced low levels of this toxin.

According to Kitchen *et al.* (1977), who conducted the most extensive study of ochratoxin toxicosis in dogs, the kidney is the primary target organ of ochratoxin A. Clinical signs in dogs include anorexia, emesis, retching, tenesmus, polydipsia, poliuria, prostration and death. The same author found synergism between ochratoxin A and citrinin, with severity of clinical disease and mortality increased when both mycotoxins were combined. *P. citrinum* is the principal citrinin producer. This fungus was the most frequently *Penicillium* species isolated in this study. Likewise ochratoxin A, citrinin has the kidney as primary target organ (Pitt, 2000).

Concluding, moulds can cause problems as spoilage microorganisms in dry pet foods. Mycological analysis has demonstrated fungal presence in 74% of pet food evaluated, with a biota mainly composed by moderately xerophilic fungi. The genera *Aspergillus*, *Eurotium* and *Penicillium* were predominant. Capability to produce aflatoxin B1 and ochratoxin A was found in some isolates of *A. flavus* and *A. ochraceus*, respectively. Aw levels of samples evaluated were low, however conservation in inadequate conditions can allow microorganisms multiplication and synthesis of mycotoxins, representing a risk for companion animals safety.



**Figure 1:** Distribution of mycobiota in commercial dry food to cat and dog consumption.

**Table 1:** Water activity in pet foods according to animal category.

Category	Total			Cat			Dog		
	N° of sam- ples	Mean	Aw Ranged	N° of sam- ples	Mean	Aw Ranged	N° of sam- ples	Mean	Aw Ranged
Puppy and kitten	6	0.632	0.543-0.816.	2	0.548	0.543-0.552	4	0.674	0.542-0.816
Adult	47	0.605	0.453-0.820	18	0.576	0.453-0.680	29	0.624	0.507-0.820
Senior	1	0.531	0.530-0.532	0	-	-	1	0.531	0.530-0.532

**Table 2: Frequency of species belong to most prevalent fungi isolated from dry pet foods**

Fungi	Number of samples (Frequency %)		
	Total samples	Cat food	Dog food
<b><i>Aspergillus sp. and Teleomorphs</i></b>	<b>37 (68.52)</b>	<b>13 (65)</b>	<b>24 (70.6)</b>
<i>A. niger</i>	22 (40.74)	9 (45)	13 (38.24)
<i>A. candidus</i>	20 (37.04)	10 (50)	10 (29.41)
<i>A. fumigatus</i>	11 (20.37)	5 (25)	6 (17.65)
<i>A. flavus</i>	10 (18.52)	5 (25)	5 (14.71)
<i>A. terreus</i>	9 (16.67)	3 (15)	6 (17.65)
<i>A. versicolor</i>	7 (12.96)	1 (5)	6 (17.65)
<i>A. sclerotiorum</i>	3 (5.56)	3 (15)	0
<i>A. ochraceus</i>	3 (5.56)	2 (10)	1 (2.94)
<i>A. oryzae</i>	2 (3.70)	0	2 (5.88)
<i>A. penicillioides</i>	2 (3.70)	2 (10)	0
<i>A. wentii</i>	2 (3.70)	0	2 (5.88)
<i>A. sindowii</i>	1 (1.85)	0	1 (2.94)
<i>A. ustus</i>	1 (1.85)	1 (5)	0
<i>E. nidulans</i>	7 (12.96)	3 (15)	4 (11.76)
<i>E. amstelodami</i>	13 (24.07)	7 (35)	6 (17.65)
<i>E. repens</i>	11 (18.52)	7 (35)	4(11.96)
<i>E. chevalieri</i>	3 (5.56)	2 (10)	1 (2.94)
<i>E.rubrum</i>	1 (1.85)	0	1(2.94)
<b><i>Penicillium sp.</i></b>	<b>24 (44.44)</b>	<b>11 (55)</b>	<b>13 (47.06)</b>
<i>P. citrinum</i>	8 (14.81)	3 (15)	5 (14.70)



<i>P. fellutanum</i>	3 (5.56)	2 (10)	1 (2.94)
<i>P. brevicompactum</i>	2 (3.70)	1 (5)	1 (2.94)
<i>P. corylophilum</i>	2 (3.70)	1 (5)	1 (2.94)
<i>P. griseofulvum</i>	2 (3.70)	1 (5)	1 (2.94)
<i>P. funiculosum</i>	2 (3.70)	0	2 (5.88)
<i>P. purpurogenum</i>	2 (3.70)	1 (5)	1 (2.94)
<i>P. spinulosum</i>	2 (3.70)	2 (10)	0
<i>P. aurantiogriseum</i>	1 (1.85)	1 (5)	0
<i>P. citreonigrum</i>	1 (1.85)	0	1 (2.94)
<i>P. crustosum</i>	1 (1.85)	0	1 (2.94)
<i>P. decubens</i>	1 (1.85)	0	1 (2.94)
<i>P. marneffeii</i>	1 (1.85)	0	1 (2.94)
<i>P. pinophilum</i>	1 (1.85)	1 (5)	0
<i>P. simplicissimum</i>	1 (1.85)	0	1 (2.94)
<b><i>Fusarium sp.</i></b>	<b>18 (33.33%)</b>	<b>8 (40)</b>	<b>10 (29.41)</b>
<i>F. proliferatum</i>	14 (25.93)	7 (35)	7 (20.59)
<i>F. verticillioides</i>	6 (11.12)	2 (10)	4 (11.76)

---

**Table 3: Mycotoxins related to some fungal species isolated from dog and cat food (Adapted from Frisvad & Thrane, 1996).**

---

## 1. ORDEM EUROTIALES

---

*Byssochlamys* (anamorph *Paecilomyces*)

*Paecilomyces variotii*: patulin, viriditoxin

*Talaromyces* (anamorph *Penicillium* subgenus *Biverticillium*)

*Penicillium funiculosum*: patulin

*P. purpurogenum*: rubratoxin B

*Eupenicillium* (anamorph *Penicillium* subgenus *Aspergilloides*, *Furcatum* and *Penicillium*)

*P. aurantiogriseum*: penicilic acid, verrucisidin, glycopeptides nephrotoxic

*P. brevicompactum*: botryodiploidin, mycophenolic acid

*P. citrinum*: citrinin

*P. crustosum*: roquefortin C, penitrem A, terrestric acid

*P. expansum*: roquefortin C, penitrem A, patulin, citrinin, comunesins, chaetoglobosin C

*Eurotium* (anamorph *Aspergillus* subgenus *Aspergillus*)

*E. amstelodami*: physcion, echinulin, sterigmatocystin

*E. chevalieri*: physcion, echinulin

*E. repens*: physcion, echinulin, sterigmatocystin

*Petromyces* (anamorph *Aspergillus* subgenus *Circundati*)

*Aspergillus candidus*: kojic acid, terfenilin, xanthoascen

*A. flavus*: kojic acid, 3-nitropropionic acid, cyclopiazonic acid, aflatoxin B1, aspergic acid

*A. niger*: ocratoxin A, malformins, nafto-pirons

*A. ochraceus*: penicilic acid, ocratoxin A, xanthomegnin, viomelein, vioxantin

*A. oryzae*: kojic acid, cyclopiazonic acid, 3-nitropropionic acid

*A. sclerotiorum*: penicilic acid, ocratoxin A

*A. wentii*: emodin, wentilactone

*Neosartorya* (anamorph *Aspergillus* subgenus *Fumigati*)

*A. fumigatus*: gliotoxin, verruculogen, fumitremorgens A e B, fumitoxins, triptoquivalins

---

---

*Emericella* (anamorph *Aspergillus* subgenus *Nidulantes*)

*E. nidulans*: sterigmatocystin, nidulotoxin, penicilin

*A. versicolor*: sterigmatocystin, nidulotoxin

*A. ustus*: austamida, austidiol, austins, austocistins

*A. sydowii*: sterigmatocystin

*Fenellia* (anamorph: *Aspergillus* subgenus *Flavipedes*)

*A. terreus*: terrein, patulin, citrinin, citreoviridin, territrens

---

## REFERENCES

- Barnett, H.L., Hunter, B., (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. The American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, Minnesota. 218 p.
- Beuchat, L.R., 1987. Influence of water activity on sporulation, germination, outgrowth, and toxin production. In: L.D. Rockland, L.R. Beuchat (Eds.) *Water Activity: Theory and applications to food*. Marcel Dekker, Inc, New York, 153-172.
- Bláha, J., Jíglinská, E., Veselý, D., Jelínek, R., 1990. The effects of moulds on the nutritional value of wheat. *Animal Feed Science and Technology* 28 (3-4), 315-324.
- Böhm, J., Razzazi-Fazeli, E., 2005. Effects of mycotoxins on domestic pet species. In: D. Diaz (Ed.) *The mycotoxin blue book*. Nottingham University Press, 77-91.
- Bueno, D.J., Silva, J.O., Oliver, G., 2001. Mycoflora in commercial pet foods. *Journal of Food Protection* 64(5), 741-743.
- Bullerman, L.B., Hartung, T.E., 1973. Mycotoxin-producing potential of molds isolated from flour and bread. *Cereal Science Today* 18, 346-347.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Svendsen, J.A., 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 581-585.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U., 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 33(1), 85-102.
- Hocking, A.D., Pitt, J.I., 1987. Media and methods for detection and enumeration of microorganisms with consideration of water activity requirements. In: L.D. Rockland, L.R. Beuchat (Eds.) *Water Activity: Theory and applications to food*. Marcel Dekker, Inc, New York, 153-172.

Kitchen, D.N., Carlto, W.W., Tuite, J., 1977. Ochratoxin A and citrininn induced nephrosis in Beagle dogs. I. Clinical and clinicopathological features. *Veterinary Pathology* 14(2), 154-172.

Maia, P.P., Siqueira, M.E.P.B., 2002. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in some Brazilians pet foods. *Food Additives and Contaminants* 19 (12), 1180-1183.

Martins, M.L., Martins, H.M., Bernardo, F., 2003. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 98 (548), 179-183.

Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University Press, PA.

Pitt, J.I., 2000. *A laboratory guide to common penicillium species*. Division of Food Research, Sydney.

Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. *Fungi and food spoilage*. Division of Food Research, Sydney.

Scudamore, K.A., Hetmanski, M.T., Nawaz, S., Naylor, J., Rainbird, S., 1997. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. *Food Additives and Contaminants*. 14(2), 175-186.

### **Acknowledgments**

MVC Thanks to Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) which supported this research, to Dra Marta Taniwakii for help on *Penicillium* identification and to Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) for a post-graduation grant.

### 3 CONCLUSÕES GERAIS

O ágar dicloram glicerol 18% foi mais eficaz que os meios ágar batata acidificado e ágar dicloram rosa de bengala para isolamento e quantificação de fungos presentes em rações secas para cães e gatos, embora estatisticamente não tenha sido observada diferença significativa.

Os valores de  $A_w$  verificados variaram de 0,45 a 0,82. Na média os valores de  $A_w$  encontrados em rações para cães foram superiores às para gatos, entretanto não foi constatada correlação entre  $A_w$  e quantidade de fungos presentes.

A quantidade de fungos isolados neste tipo de alimento foi baixo ( $0-10^3$  UFC/g), com uma microbiota composta principalmente por espécies moderadamente xerofílicas, algumas das quais relacionadas com a deterioração de alimentos com baixa atividade de água.

Foram isolados 23 gêneros diferentes, além de fungos classificados apenas como *Mycelia sterilia* e leveduras.

Os gêneros que apresentaram maior frequência de isolamento nas rações: *Aspergillus*, *Eurotium*, *Penicillium* e *Fusarium*, são potencialmente produtores de micotoxinas.

Verificou-se que 20% (2/10) dos isolados de *Aspergillus flavus* eram produtores de aflatoxina B1, todos (3/3) os isolados de *Aspergillus ochraceus* eram produtores de ocratoxina A e todos (22/22) os isolados de *Aspergillus niger* foram incapazes de sintetizar esta toxina.

**4 ANEXOS**



## Anexo 1: Micotoxinas relacionadas a espécies potencialmente produtoras

(Moss 1991, Mantle 1991, Chen *et al.*, 1992, Bullerman 1997, Hocking 1997, Pitt 1997, Logrieco *et al.*, 1998, Heenan *et al.*, 1998, Desjardins & Proctor 2001).

### Ácido ciclopiazônico

*Aspergillus flavus* Link  
*Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn  
*Aspergillus tamarii* Kita  
*Penicillium camemberti* Thom  
*Penicillium chrysogenum* Thom  
*Penicillium commune* Thom  
*Penicillium griseofulvum* Dierckx  
*Penicillium viridicatum* Westling

### Ácido penicílico

*Aspergillus melleus* Yukawa  
*Aspergillus ochraceus* Wilhelm  
*Aspergillus sclerotiorum* Huber  
*Aspergillus sulphureus* (Fres.) Thom  
 & Church  
*Penicillium aurantiogriseum* Dierckx  
*Penicillium roqueforti* Thom  
*Penicillium simplicissimum* (Oudem.)  
 Thom  
*Petromyces alliaceus* (Thom &  
 Church) Malloch & Cain

### Ácido secalônico D

*Aspergillus aculeatus* Iizuka  
*Penicillium oxalicum* Currie & Thom

### Ácido tenuazônico

*Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl.  
*Alternaria citri* Ellis & Pierce  
*Alternaria solani* Sorauer  
*Phoma exigua* Desm.  
*Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema

### Aflatoxinas

*Aspergillus flavus* Link  
*Aspergillus nomius* Kurtzman *et al.*  
*Aspergillus parasiticus* Speare

### Alcalóides do Ergot

*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.  
*Neotyphodium coenophialum*  
 (Morgan Jones & Gams) Glenn, Bacon &  
 Hanlin  
*Neotyphodium lolii* (Latch,  
 Christensen & Samuels) Glenn, Bacon &  
 Hanlin

### Altenueno

*Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl.

### Alternariol

*Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl.  
*Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc.  
*Alternaria citri* Ellis & Pierce  
*Alternaria solani* Sorauer

### Citocalasinas

*Aspergillus clavatus* Desm.  
*Phoma herbarum* Westend.

### Cicloclorotina

*Penicillium islandicum* Sopp

### Citrinina

*Aspergillus terreus* Thom  
*Monascus ruber* Tiegh.  
*Penicillium citrinum* Thom  
*Penicillium expansum* Thom  
*Penicillium verrucosum* Dierckx

**Citroviridina**

*Aspergillus terreus* Thom

*Eupenicillium ochrosalmoneum* DB  
Scott & Stolk

*Penicillium citreonigrum* Dierckx

**Desoxinivalenol**

*Fusarium culmorum* (W.G. Smith)  
Sacc.

*Fusarium graminearum* Schwabe

*Fusarium poae* (Peck) Wollenw.

*Fusarium sporotrichioides* Sherb.

**Diacetoxiscirpenol**

*Fusarium equiseti* (Corda) Sacc.

*Fusarium semitectum* Berk. &  
Ravenel

*Fusarium poae* (Peck) Wollenw.

*Fusarium sambucinum* Fuckel

**Eslaframina**

*Macrophomina phaseolina* (Tassi)  
Goid.

**Esporidesmina**

*Pithomyces chartarum* (Berk. &  
Curt.) M.B. Ellis

**Esterigmatocistina**

*Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab.

*Aspergillus sydowi* (Bain et Sart)  
Thom et Church

*Drechslera sorokiniana* (Sacc.)  
Subram. & Jain

*Emericella nidulans* (Eidam) Vuill.

*Emericella rugulosa* (Thom et Raper)  
Benajmin

*Eurotium amstelodami* Mangin

*Eurotium repens* de Bary

**Fumitremórgenos**

*Aspergillus fumigatus* Fresen.

*Neosartorya fischeri* (Wehmer)  
Malloch & Cain

**Fumonisin**

*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler f.  
sp. *lycopersici*

*Fusarium fujikuroi* Nirenberg

*Fusarium nygamai* Burgess &  
Timboli

*Fusarium proliferatum* (Matsush.)  
Nirenberg

*Fusarium verticilloides* (Sacc.)  
Nirenberg

**Gliotoxina**

*Aspergillus fumigatus* Fresen.

**Griseofulvina**

*Penicillium aethiopicum* Frisvad

*Penicillium canescens* Sopp

*Penicillium griseofulvum* Dierckx

*Penicillium janczewskii* K M Zalessky

*Penicillium raistrickii* G. Sm.

**Luteoskirina**

*Penicillium islandicum* Sopp

**Moniliformina**

*Fusarium acuminatum* Ellis & Everh.

*Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc.

*Fusarium fujikuroi* Nirenberg

*Fusarium nygamai* Burgess &  
Timboli

*Fusarium oxysporum* Schlecht.

*Fusarium proliferatum* (Matsush.)  
Nirenberg

*Fusarium subglutinans* (Wollenw. &  
Reinking) Nelson *et al.*

*Fusarium thapsinum* Klittich *et al.*

**Neosolaniol**

*Fusarium acuminatum* Ellis & Everh.

*Fusarium chlamidosporum* Wollenw.  
& Reinking

*Fusarium semitectum* Berk. &  
Ravenel

*Fusarium sporotrichioides* Sherb.

### **Nivalenol**

*Fusarium graminearum* Schwabe

*Fusarium poae* (Peck) Wollenw.

*F. semitectum* Berk. & Ravenel

*Fusarium sporotrichioides* Sherb.

### **Ocratoxina A**

*Aspergillus ochraceus* Wilhelm

*Aspergillus alliaceus* Thom & Church

*Aspergillus carbonarius* (Bainier)  
Thom

*Aspergillus melleus* Yukawa

*Aspergillus niger* Tiegh.

*Aspergillus sclerotiorum* Hüber

*Aspergillus sulphureus* (Fres.) Thom  
& Church

*Penicillium verrucosum* Dierckx

### **Patulina**

*Aspergillus clavatus* Desm.

*Aspergillus giganteus* Wehmer

*Byssochlamys fulva* Olliver & G Sm.

*Byssochlamys nivea* Westling

*Penicillium expansum* Thom

*Penicillium funiculosum* Thom

*Penicillium griseofulvum* Dierckx

*Penicillium roqueforti* Thom

*Penicillium vulpinum* (Cooke &  
Masse) Seifert & Samson

### **Penitrem A**

*Penicillium canescens* Sopp

*Penicillium crustosum* Thom

*Penicillium glandicola* (Oudem.) Seif.  
& Samson

*Penicillium janczewskii* K M Zalessky

### **Psoralenos**

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de  
Bary

### **Rizonina**

*Rhizopus microsporus* Tiegh.

### **Roridinas**

*Myrothecium roridum* Tode ex Fr.

### **Rubratoxina B**

*Penicillium purpurogenum* Stoll

### **Roquefortina C**

*Penicillium aurantiogriseum* Dierckx

*Penicillium chrysogenum* Thom

*Penicillium griseofulvum* Dierckx

*Penicillium hirsutum* Dierckx

*Penicillium roqueforti* Thom

### **Satratoxinas**

*Stachybotrys chartarum* (Ehrenb. ex  
Link) Hughes

*Memnoniella echinata* (Riv.)  
Galloway

### **Territrems**

*Aspergillus terreus* Thom

### **Toxina PR**

*Penicillium roqueforti* Thom

### **Toxina T-2**

*Fusarium acuminatum* Ellis & Everh.

*Fusarium chlamidosporum* Wollenw.  
& Reinking

*Fusarium poae* (Peck) Wollenw.

*Fusarium sporotrichioides* Sherb.

### **Tricotecina**

*Trichothecium roseum* (Pers.) Link

### **Verrucarinas**

*Myrothecium verrucaria* (Alb. &  
Schw.) Ditm. ex Fr.

### **Verruculógeno**

*Aspergillus fumigatus* Fresen.

*Neosartorya fischeri* (Wehmer)  
Malloch & Cain

*Penicillium paxilli* Bainier

*Penicillium simplicissimum* (Oudem.)  
Thom

**Viomelheína**

*Penicillium aurantiogriseum* Dierckx

*Penicillium viridicatum* Westling

**Xantomegnina**

*Eupenicillium javanicum* (JFH  
Beyma) Stolk & DB Scott

*Penicillium aurantiogriseum* Dierckx

*Penicillium viridicatum* Westling

**Zearalenona**

*Fusarium culmorum* (W.G. Smith)  
Sacc.

*Fusarium crookwellense* Burgess,  
Nelson & Toussoun

*Fusarium equiseti* (Corda) Sacc.

*Fusarium graminearum* Schwabe.

*Fusarium heterosporum* Nees=Fr.

## Anexo 2: Formulações dos meios de cultivos.

### Ágar Batata Glicose Acidificado (PDA)\*

Batatas brancas	250g
Glicose	20g
Agar	15g
Água destilada	q.s.q. 1L

Lavar e fatiar as batatas, cozinhar por 30-45 min. em 500mL de água destilada. Concomitantemente dissolver o ágar em 500mL de água destilada. Filtrar as batatas através de camadas de gaze dentro do frasco contendo o ágar dissolvido, passando parte do purê obtido. Adicionar a glicose e restaurar o volume para 1L. Autoclavar a 121°C durante 15 min. Ajustar o pH final para 3,5 com solução de ácido tartárico a 10%.

\* Utilizado para isolamento e quantificação de fungos em alimentos. Quando não acidificado com ácido tartárico, o meio também é utilizado para identificação do gênero *Fusarium*.

### Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA)\*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
Concentrado de Czapek	10mL
Solução com traços de metal**	1mL
Extrato de Levedura	5g
Sacarose	30g
Agar	15g
Água destilada	1L

Autoclavar a 121°C durante 15 min., pH final 6,7.

\*\* Solução com traços de metal

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,5g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1g
Água destilada	100mL

\* Utilizado na identificação dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

### Ágar Czapek Extrato de Levedura com 20% de sacarose (CY20S)\*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
Concentrado de Czapek	10mL
Extrato de Levedura	5g

Sacarose	200g
Agar	15g
Água destilada	1L

Autoclavar a 121°C durante 15 min., pH final 5,2.

\* Utilizado na identificação do gênero *Eurotium*.

#### **Ágar Dicloram Glicerol 18% (DG18)\***

Glicose	10g
Peptona	5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5g
Glicerol	220g
Agar	15g
Dicloram	2mg
Cloranfenicol	100mg
Água destilada	1L

Dissolver os ingredientes menores em 800mL de água destilada e aquecer até dissolver o ágar e completar para 1000mL de água destilada. Adicionar o glicerol. Autoclavar a 121°C durante 15 min., pH final. A aw deste meio é 0,955 e o pH varia de 5,5 para 5,8.

\* Utilizado para isolamento e quantificação de fungos em alimentos com umidade intermediária.

#### **Ágar Dicloram Rosa de Bengala e Cloranfenicol (DRBC)\***

Glicose	10g
Peptona	5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5g
Agar	15g
Rosa de Bengala	25mg
Dicloram	2mg
Cloranfenicol	100mg
Água destilada	1L

Autoclavar a 121°C durante 15 min., pH final varia entre 5,5 e 5,8. Manter protegido de luz direta durante a manufatura e incubação.

\*Utilizado para quantificação de fungos em alimentos.

**Ágar Extrato de Levedura e Sacarose (YES)\***

Extrato de levedura	20g
Sacarose	150g
Agar	20g
Água destilada	1L

Autoclavar a 121°C durante 15 min.

\*Utilizado para avaliação da produção de metabólitos secundários por diferentes espécies fúngicas.

**Ágar Extrato de Malte (MEA)\***

Extrato de malte	20g
Peptona	1g
Glicose	20g
Agar	20g
Água	1L

Autoclavar a 121°C durante 15 min., pH final 5,6.

\* Utilizado na identificação dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

**Ágar Folhas de Cravo (CLA)\***

ágar	15g
Água destilada	1L

Autoclavar a 121°C durante 15 min. Adicionar 5-7 pedaços de folhas de cravo estéreis à placas de Petri pequenas e acrescentar o meio à aproximadamente 50°C.

\* Utilizado para identificação do gênero *Fusarium*.

**Ágar Neutro de Creatina e Sacarose (CSN)\***

Concentrado CS**	10mL
Sacarose	10g
Creatina	5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
Vermelho de Bromocresol	0,05g
Agar	15g

Água destilada	q.s.q. 1L
----------------	-----------

**\*\* Concentrado CS**

KCl	5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,05g
Água destilada	q.s.q. 100mL

Autoclavar a 121°C durante 15 min., pH final entre 5,5 e 6,8.

\*Utilizado na identificação de espécies de *Penicillium* subgênero *Penicillium*

**Ágar Nitrato Glicerol 25% (G25N)\***

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,75g
Concentrado de Czapek	7,5mL
Extrato de Levedura	5g
Glicerol	250g
Agar	12g
Água destilada	750mL

Autoclavar a 121°C durante 15 min., pH final 7,0.

\* Utilizado na identificação do gênero *Penicillium*.

**Concentrado de Czapek\***

NaNO <sub>3</sub>	30g
KCl	5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g
Água destilada	q.s.q 100mL

Não é necessário autoclavar. Agitar antes do uso para re-suspender os precipitados.

\*Utilizado na formulação dos meios CYA, CY20S e G25N



## 5 REFERÊNCIAS

1. BEARDALL, J..M.; MILLER, J.D. Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. In: **Mycotoxins in Grain: Compounds Other Than Aflatoxin**. J. D. Miller & H. L. Trenholm, eds. Eagan Press, St. Paul, MN, 1994, p. 487-540
2. BEUCHAT, L.R. Influence of water activity on sporulation, germination, outgrowth, and toxin production. In: **Water activity: Theory and applications to food**. L.B. Rockland & L.R. Beuchat, eds. Institute of Food Technologists, Chicago, IL, 1987, p. 137-151.
3. BLÁHA, J.; JÍČINSKÁ, E.; VESELÝ, D.; JELÍNEK, R. The effect of moulds on the nutritional value of wheat. **Animal Feed Science and Technology**, v. 28 n. 3-4 p. 315-324, 1990.
4. BÖHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E. Effects of mycotoxins on domestic pet species. In: D. Diaz (Ed.) **The mycotoxin blue book**. Nottingham University Press, 2005, 77-91.
5. BULLERMAN, L.B. Fusaria and toxigenic molds and other Aspergilli and Penicillia. In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montille, T. J. (Eds.), **Food microbiology. Fundamentals and frontiers**, Washington DC, 1997, p. 419-434.
6. BURGESS, H.M., MELLENTIN, R.W. **Animal food and method of making the same**. U.S. patent 3,202,514. 1965.
7. CHEN, J.P.; MIROCHA, C.J.; XIE, W.P.; HOGGE, L.; OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B1 by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3928-3931, 1992.
8. CHIRIFE, J.; FAVETTO, J. Some physico-chemical basis of food preservation by combined methods. **Applied Technology**, v.25, p.389- 96, 1992.
9. DE RUITER, G.A., NOTERMANS, S.H.W., ROMBOOTS, F.M. New methods in food mycology. **Trends in Food Science & Technology**, v.4, p. 91-97, 1993.
10. DESJARDINS, A.E.; MANANDHAR, H.K.; PLATTNER, R.D.; MANANDHAR, G.G.; POLING, S. M.; MARAGOS, C. M. *Fusarium* species from Nepalese rice and production

- of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1020-1025, 2000.
11. FERNADEZ PINTO, V.E.; VAAMONDE, G. Hongos productores de micotoxinas en alimentos. **Revista Argentina de Microbiología**, v.28, p. 147-162, 1996.
  12. FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p. 85-102, 1996.
  13. HEENAN, C.N.; SHAW, K.J.; PITT, J.I. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. **Journal of Food Mycology**, v. 1, p. 67-72, 1998.
  14. HOCKING, A.D.; HOLDS, K.; TOBIN, N.F. Intoxication by tremorgenic mycotoxin (Penitrem A) in a dog. **Australian Veterinary Journal**. v. 65, p. 82-85, 1988.
  15. HOCKING, A.D. Toxigenic *Aspergillus* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, eds. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, Washington, 1997, p. 393-405.
  16. HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Dichloran glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 39, p. 488-492, 1980.
  17. IARC. **Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. IARC Monographs, Lyons, France 1993, 599 p.
  18. KETTERER, P.J.; WILLIAMS, E.S.; Blaney, B.J.; Connole, M.D. Canine aflatoxicosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 51, p. 355-357, 1979.
  19. KING, A.D.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Dichloran rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 959-964, 1979.
  20. JAY, J.M. **Microbiología moderna de los alimentos**, 2ª ed. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha, 1978, 491p.

21. LEISTNER, L. Food preservation by combined methods. **Applied Technology**, v. 25, p. 151– 158, 1992.
22. LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; CASTELLA, G.; KOSTECKI, M.; GOLINSKI, P.; RITIENI, A.; CHELKOWSKI, J. Beauvericin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3084-3088, 1998.
23. MANTLE, P.G. Miscellaneous toxigenic fungi. In: Smith JE, Henderson RS, eds. **Mycotoxins and Animal Foods**. CRC Press, Boca Ratón, 1991, p.141-152.
24. MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Cenário da produção pet food no Brasil do ponto de vista da regulamentação, 2002. Disponível em: <<http://www.visionline.com.br/roche/forumpet/palestras/p3.htm>> Acesso em: 04 jun. 2005.
25. MOSS, M.O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: Smith JF, Henderson RS, eds. **Mycotoxins and Animal Foods**. CRC Press, Boca Ratón. 1991, p. 37-56.
26. NORTHOLT, M.D.; VAN EGMOND, H.P.; SOENTORO, P.; DEIJLL, E. Fungal growth and the presence of sterigmatocystin in hard cheese. **Journal of the Association of the Official Analytic Chemistry**, v. 63, p. 115-119, 1980.
27. PERAICA, M., RADIC, B., LUCIC, A., PAVLOVIC, M. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of World Health Organization**, v.77, n. 9, p.754-766.
28. PETSKA, J.J. & BONDY, G.S. Immunotoxic effects of mycotoxins. In: **Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin**. J. D. Miller & H. L. Trenholm, eds. Eagan Press, St. Paul, MN, 1994, p. 339-358.
29. PITT, J.I. Toxigenic *Penicillium* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, eds. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, Washington. 1997, p. 406-418.
30. PULS, R.; LADYMAN, E. Roquefortine toxicity in a dog. **Canadian Veterinary Journal**, v. 29, p. 569, 1988.

31. SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTEMBORG, O. Methods for the detection and isolation of food-borne fungi. *In*: Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filteborg **Introduction to food-borne fungi**. CBS, The Netherlands, 5<sup>th</sup> ed , 1996, p. 261-269.
32. SARGEANT, K.; SHERIDAN, A.; O'KELLY, J.; CARNAGHAN, R.B.A. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, v.192, p.1096, 1961.