



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

TALYANNY FERNANDES FRANCO

TRIAGEM TOXICOLÓGICA: DETECÇÃO DE AFLATOXINA B1 EM AMOSTRAS DE
RAÇÃO PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO.

NATAL-RN
2020

TALYANNY FERNANDES FRANCO

TRIAGEM TOXICOLÓGICA: DETECÇÃO DE AFLATOXINA B1 EM AMOSTRAS DE RAÇÃO PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Herbert Ary Sisenando.

NATAL-RN
2020

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Franco, Talyanny Fernandes.

Triagem toxicológica: detecção de aflatoxina B1 em amostras de ração para animais de estimação / Talyanny Fernandes Franco. - 2020.

24f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso - TCC (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia. Natal, RN, 2020.

Orientador: Herbert Ary Arzabe Antezama Costa Nobrega Sisenando.

1. Ração animal - TCC. 2. Aflatoxina - TCC. 3. Cromatografia delgada - TCC. 4. toxicologia - TCCT. I. Sisenando, Herbert Ary Arzabe Antezama Costa Nobrega. II. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 636.084.41

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda sabedoria a mim concedida e por me abençoar a cada passo dado nessa trajetória. Sou grata por Seus planos coincidirem com os meus.

À minha família, por acreditar no meu potencial, principalmente aos meus pais, Andrea e Franco, os quais estiveram comigo em todas as dificuldades, sendo meu alicerce. Hoje finalizo mais um ciclo, mas todos os méritos são nossos.

À minha irmã Haryanny, que é a razão da minha persistência em buscar o melhor. Que eu seja exemplo e espelho na sua caminhada em busca de tudo que você almeja.

Ao Anderson Pablo, por toda a compreensão, apoio e carinho oferecidos a mim nos momentos em que mais precisei, me dando forças e me fazendo acreditar que eu sou capaz de muito mais.

À minha amiga Larissa Fernanda, que percorreu esse caminho ao meu lado desde o início desse sonho, compartilhando comigo as alegrias, as tristezas e os obstáculos. Hoje dividimos também essa conquista que nos uniu.

Ao grupo “Asterisco”, formado por Larissa, Housemberg, Conceição, Iasmim e Iago, responsáveis por tornar esse período menos árduo e fazer a rotina cansativa ser mais leve. Nossa relação extrapolou os limites acadêmicos e se tornou apoio, companheirismo, carinho, apreço, admiração, ou seja, AMIZADE.

Aos demais amigos que torceram por mim, em especial à Danielle, Isadora, Laryssa Caroline e Guilherme, os quais me incentivaram nos momentos de incertezas e compartilharam comigo o melhor de si.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – DACT da UFRN pela disponibilização dos materiais e reagentes utilizados na pesquisa, bem como o espaço e equipamentos do Laboratório de Toxicologia – Labtox.

À Thaynara, por sua contribuição na execução desse trabalho, bem como às técnicas do LabTox, Juliana e Zama, que nos auxiliaram no decorrer do projeto.

Ao meu orientador Herbert, que me acolheu com paciência, respeito e atenção, me fornecendo assistência em todo desenvolvimento da pesquisa.

Aos demais professores, responsáveis por minha formação como pessoa e profissional, em especial aos membros da banca, por seu interesse e disponibilidade.

SUMÁRIO

ARTIGO - TRIAGEM TOXICOLÓGICA: DETECÇÃO DE AFLATOXINA B1 EM AMOSTRAS DE RAÇÃO PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO.....	5
1 INTRODUÇÃO	8
2 MATERIAL E MÉTODO	10
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
4 CONCLUSÃO.....	17
REFERÊNCIAS	17
ANEXOS	20
Anexo 1: Normas de publicação da revista REVINTER - REVISTA INTERTOX DE TOXICOLOGIA, RISCO AMBIENTAL E SOCIEDADE.....	21
Anexo 2: Imagens dos experimentos sob luz UV.	21

ARTIGO:

TRIAGEM TOXICOLÓGICA: DETECÇÃO DE AFLATOXINA B1 EM AMOSTRAS DE RAÇÃO PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO.

TOXICOLOGICAL SCREENING: DETECTION OF AFLATOXIN B1 IN PET FOOD SAMPLES.

Talyanny F. Franco¹, Thaynara M. G. Dantas¹, George Q. De Brito², Juliana V. De Medeiros³, Zama M. L. da S. Femina³, Herbert Ary Sisenando².

1. Graduanda da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

2. Professor da UFRN - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

3. Técnicas de laboratório da UFRN - Departamento de Análises Clínicas e toxicológicas.

RESUMO

A aflatoxina é uma classe de micotoxina produzida principalmente por fungos do gênero *Aspergillus* sp. e é caracterizada por seu alto potencial carcinogênico, encontrada sobretudo em alimentos utilizados como base para a produção de rações destinadas à nutrição animal e até mesmo no produto final. Esse estudo objetivou a identificação de aflatoxina B em rações para alimentação animal por método qualitativo com o intuito de associar os resultados obtidos a fatores extrínsecos, como umidade e temperatura. Foram utilizados seis exemplares de rações, classificadas de acordo com o custo de aquisição, o tipo de animal a qual se destina e também o período em que foram adquiridas no comércio local. Ao todo, foram analisadas 12 amostras em duplicata. O método de extração e purificação desta pesquisa foi adaptado da metodologia determinada pela *International Official Methods of Analysis* (AOAC), o qual se apresentou eficiente em testes que antecederam a análise das amostras do estudo. Na detecção da toxina, empregou-se a cromatografia em camada delgada, com posterior revelação química utilizando solução aquosa de ácido sulfúrico 25% sobre a placa cromatográfica, para análise sob luz ultravioleta. Apesar das amostras avaliadas apresentarem algumas marcas na separação cromatográfica, ao utilizar o revelador químico pode-se inferir que estas não expressaram resultados positivos quanto a contaminação de aflatoxina B1. Contudo, não é possível afirmar que as amostras não estão contaminadas, visto que há a necessidade de utilização de métodos analíticos mais sensíveis para identificar esse tipo de micotoxina.

Palavras-chave: ração animal; aflatoxina; cromatografia delgada; toxicologia.

ABSTRACT

Aflatoxin is a class of mycotoxin produced mainly by fungi of the genus *Aspergillus* sp. It is characterized by its high carcinogenic potential and is found mainly in foods used as a basis for animal nutrition products and even in the final product itself. This study aimed to identify the aflatoxin B1 presence in Pet food using the qualitative method aiming to associate the results obtained with extrinsic factors, such as humidity and temperature. Six specimens of pet food were used, classified according to its price, the type of animal for which it is intended, and the period they were acquired in the local market. Altogether, 12 samples were analyzed in duplicate. The extraction and purification method of this research was adapted from the methodology determined by the *International Official Methods of Analysis (AOAC)*, which was efficient in tests that preceded the analysis of the study samples. For the detection of the toxin, the thin-layer chromatography was used, with subsequent chemical development using a 25% aqueous solution of sulfuric acid on the chromatographic plate, for analysis under ultraviolet light. Although the samples evaluated showed some marks in the chromatographic separation when using the chemical developer, it can be inferred that these did not express positive results regarding the aflatoxin B1 contamination. However, it is not possible to state that the samples are not contaminated since there is a need to use more sensitive analytical methods to identify this type of mycotoxin.

Keywords: pet food; aflatoxin; thin-layer chromatography; toxicology;

1 INTRODUÇÃO

O mercado destinado à produção de alimentos para animais de estimação (*PET*) tem-se expandido ao longo dos anos, e isso está interligado ao aumento dessa população em diversos países. No Brasil, esse crescimento é demonstrado através de dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet), que em 2013 o apontou como quarto país em número de animais de estimação no mundo, resultando em um total de 132 milhões de animais, sendo ainda responsável pelo segundo maior em número de cães, gatos e aves canoras e ornamentais do mundo (ABINPET, 2014). Dados mais recentes divulgados pela Abinpet mostram que o Brasil possui atualmente 141,6 milhões de animais, dentre estes, 55,1 milhões são cães, 24,7 milhões são de gatos e 40 milhões são aves canoras e ornamentais (ABINPET, 2020). De acordo com a FORBES BRASIL (2020), a *Euromonitor International* realizou um levantamento que constata o Brasil como o segundo maior no mercado de produtos *PET*, com 6,4% de participação global.

As rações para animais utilizam diversos ingredientes em sua composição, dentre eles, cereais e vegetais, que são excelentes substratos para fungos produtores de micotoxinas (TAHIRA et al., 2015; SHAO et al., 2018), as quais podem não ser inativadas totalmente nas etapas de produção de rações (BULLERMAN, BIANCHINI, 2005). Segundo GONÇALVES, SANTANA & PELEGRINI (2017), aproximadamente 25% dos alimentos no mundo são comprometidos pela presença de fungos. Essa contaminação é ocasionada, principalmente, pelas condições climáticas de países tropicais e subtropicais, como no Brasil. Tais regiões apresentam umidade e temperatura altas, ressaltando a ocorrência de fungos nos meses em que essas se apresentam mais elevadas (COULOMBE, 1991), proporcionando uma maior contaminação destes alimentos por micotoxinas (MIDIO, MARTINS, 2000).

Apesar de existirem mais de 400 micotoxinas capazes de gerar quadros de intoxicação em animal, as Aflatoxinas, Tricotecenos, Fumonisinhas, Zearalenona, Ocratoxina A e os Alcaloides do ergot são as mais frequentes. Na classe das aflatoxinas, considera-se como as de maior interesse a B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) e G2 (AFG2), as quais são especialmente produzidas por quatro espécies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* e *A. pseudotamarii* (COUNCIL FOR AGRICULTURAL AND TECHNOLOGY, 2003; BŁAJET-KOSICKA et al., 2014).

Entretanto, *A. flavus* e *A. parasiticus* são as espécies com maior relevância econômica, responsáveis pela contaminação de alimentos em diferentes países, como por exemplo no Brasil, nos Estados Unidos, no sul da China, no sudeste da Ásia e na África, conforme a literatura relata alta incidência em diversos anos (COUNCIL FOR AGRICULTURAL AND TECHNOLOGY, 2003). O crescimento do *A. flavus* está condicionado a temperatura entre 10 e 43 °C, com a temperatura ótima aos 33 °C. Contudo, considera-se que a produção dessa micotoxina ocorra entre 13-37 °C. Quanto ao *A. parasiticus*, seu crescimento é favorecido entre 12 e 42 °C, sendo a 32 °C o ambiente mais vantajoso. A produção da aflatoxina vincula-se a temperatura de 12 a 42 °C (ICMSF, 1996).

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2002) classificou as aflatoxinas, por meio de estudos, como carcinógenos para humanos - Grupo 1. Estas são absorvidas no trato gastrintestinal e biotransformadas no fígado, o qual é afetado por neoplasias, mesmo com a ingestão de baixas dosagens. Para isso, a AFB1 sofre ativação metabólica, formando ligações covalentes com o ácido desoxirribonucléico (DNA), o ácido ribonucléico (RNA) e proteínas, gerando adutos que levam a desregulação celular, e conseqüentemente, a morte celular (MAIA, DE SIQUEIRA, 2007).

A legislação comum para todos os membros da União Europeia determina o limite de 50 µg/kg para aflatoxinas totais em matérias-primas para rações, enquanto para as rações prontas o limite é de 10 µg/kg de AFB1 (DOCE, 2006) (FAO, 2004). Já no Brasil, a RDC Nº 274 determina a dose tolerável de aflatoxinas totais em matérias-primas igual à 20 µg/kg (ppb), onde inclui as aflatoxinas B1+B2+G1+G2 (BRASIL, 2002).

A AFB1 é capaz de desencadear efeitos agudos e/ou crônicos, quando não ingerida em doses letais. A literatura demonstrou que a dose média de AFB1 capaz de estimular a produção de tumores, DT50 (µg kg⁻¹ p.c.dia⁻¹) em diversas espécies, entre elas, cães e gatos, é de DT50 igual a 1.0 e 0.6, respectivamente (DINIZ, 2002).

Devido à relevância pública desse assunto e seu impacto na saúde dos animais, o presente trabalho objetivou determinar a presença de AFB1 em rações de cães e gatos adquiridas no município de Natal/RN. Buscou-se utilizar a cromatografia em camada delgada (CCD) associada, para confirmação, ao uso de substância reveladora específica para aflatoxinas, bem como analisar se há interferência de fatores extrínsecos – custo da ração, armazenamento, temperatura e umidade do local – no desenvolvimento do fungo produtor da AFB1.

2 MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas doze amostras de rações para fins alimentares de cães, gatos e pássaros, obtidas no comércio do bairro do Alecrim, Zona Leste de Natal/RN/Brasil, as quais eram armazenadas e comercializadas em sacos abertos em temperatura ambiente e de forma granel. De acordo com dados do Instituto Nacional de Meteorologia - INMET, a cidade de Natal/RN, entre os anos de 1981-2010, apresentou a maior taxa de umidade entre os meses de junho e agosto, enquanto que o maior índice de temperatura refere-se aos meses de fevereiro e março (INMET, 2010). As amostras foram adquiridas em dois períodos distintos, sendo estes setembro/2018 e março/2019, referentes ao período úmido e seco, respectivamente. Dessa forma, coletaram-se seis amostras em cada período, sendo dois tipos de rações para cada animal. Ainda, estas amostras foram selecionadas utilizando o critério do custo de cada ração. Assim, cada tipo de ração, seja ela destinada ao consumo de cães, gatos ou pássaros, foi subdividido em duas categorias: alto custo e baixo custo, padronizados pela marca do fabricante para ambos os períodos de coleta, com o intuito de avaliar os possíveis interferentes externos. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Toxicologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde foram identificadas de acordo com o tipo e o custo, para serem trituradas e analisadas posteriormente. O material, depois de triturado em laboratório, foi acondicionado em geladeira, com o intuito de prevenir possíveis contaminações após a aquisição das amostras, e com isso, evitar a promoção de resultados falso-positivos. Ainda, após retirada a alíquota para análise, as amostras trituradas foram mantidas nessas mesmas condições com o objetivo de serem utilizadas para confirmação de resultados, se necessário.

Para a detecção das aflatoxinas, foi empregada a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de sílica com fluorescência, como preconizada na literatura (SOARES, RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Para a separação, extração e purificação da aflatoxina B1 foi utilizado o método descrito pelo *International Official Methods of Analysis* (AOAC, 1999), o qual foi adaptado na presente pesquisa. Na metodologia modificada, substituiu-se o sulfato de zinco por sulfato de cobre (TEIXEIRA, 2008). Além disso, optou-se pela utilização de processos para otimizar a etapa de extração, como o uso do banho-maria (SEKIYAMA *et al.*, 2005) e a adição do celite (TEIXEIRA, 2008), responsável por flocular os possíveis interferentes com o intuito de retirá-los na filtração.

Na CCD, utilizou-se um sistema de eluição constituído de clorofórmio - acetona - álcool isopropílico (85:10:5 v/v/v) para separar os compostos (BOTURA, 2005), e a observação foi de forma visual, pelo aparecimento de manchas fluorescentes, frente à luz ultravioleta (UV) a 254 nm, em comparação com a solução-padrão de concentração de 10µg/mL, a qual foi obtida a partir do padrão de aflatoxina B1 da marca Sigma – Aldrich e armazenada em frasco de cor âmbar, vedada e sob temperatura de congelamento. A presença ou a ausência de aflatoxinas foi confirmada por revelação química com aplicação de ácido sulfúrico 25% na cromatoplaça (ROCHA, 2008), visto que diversos estudos utilizam essa solução aquosa em distintas concentrações para o mesmo objetivo (BUGNO, 2006; SILVA, 2002).

Todas as adaptações incrementadas nesse estudo foram validadas por meio de ensaios com a solução-padrão e alíquotas de amostras de rações artificialmente contaminadas em laboratório com a solução padrão de AFB1 com concentração de 10µg/mL, as quais provaram que o método modificado foi capaz de extrair e identificar – com resultado positivo – amostras submetidas nos testes que antecederam a pesquisa realizada.

Sob essas condições, em um *Erlenmeyer*, pesou-se 12,5 g das amostras de ração previamente trituradas, onde adicionou-se a estas 7,5 mL KCl 4% e 67,5 mL de metanol, sendo a mistura colocada sob agitação por 30 minutos em agitador do tipo *shaker*. Esse procedimento foi executado em duplicata para cada uma das 12 alíquotas. Após a agitação, o extrato foi filtrado em papel de filtro, originando 37,5 mL de filtrado 1. Ao filtrado 1, adicionou-se 37,5 mL de sulfato de cobre e 1 g de celite, misturando até a floculação. O material contido no béquer foi novamente filtrado, originando 37,5 mL do filtrado 2. Transferiu-se o filtrado 2 para um funil de separação, onde se adicionou 37,5 mL de água destilada e 10 mL de clorofórmio. A partir disso, obteve-se a separação de duas fases, as quais foram homogeneizadas por 3 minutos, e retirada a fase clorofórmica do funil de separação, realizando a adição de 10 mL de clorofórmio à fase que restou. Realizou-se a mesma etapa de extração, juntando a nova fase extraída ao que foi extraído anteriormente. Após extração líquido-líquido, o extrato foi submetido ao banho-maria a 80°C até *secura*, sendo ressuspendido com 0,5 mL de clorofórmio e aplicado em cromatoplaça com o auxílio de capilar. Na mesma placa, adicionou-se também a solução-padrão, com auxílio de capilar. Após a aplicação a placa foi eluída com a fase móvel descrita anteriormente e em seguida, foi seca e visualizada utilizando a câmara UV. A determinação qualitativa foi feita pela comparação da fluorescência e do fator de retenção

(Rf) das amostras em relação ao padrão de AFB1 utilizado. Posteriormente, procedeu-se com o teste de confirmação, utilizando 10mL de solução de ácido sulfúrico 25%, a qual foi pulverizada sobre a cromatoplaça, com o intuito de observar na luz UV a mudança da fluorescência da solução padrão e das amostras que possam estar contaminadas, de azul fluorescente para amarelo-esverdeado fluorescente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de micotoxinas está relacionada com o desenvolvimento de fungos, e isso é condicionado a diversos fatores, tais como a temperatura e a umidade. O *Aspergillus flavus*, por exemplo, pode ser encontrado em 85% de umidade relativa do ar (0,85 de atividade de água) e temperatura ótima de 25-30 °C (MAIA, DE SIQUEIRA, 2007). Em grãos, a temperatura exibe grande influência na contaminação, variando entre 11 e 37 °C, proporcionando assim, o crescimento de fungos nesse tipo de alimento (ZLOTOWSKI, 2004). O surgimento das micotoxinas é facilitado também pela forma de produção e pelo armazenamento, visto que parte das rações é constituída por grãos e cereais, que são substratos dos fungos produtores.

Inicialmente, por meio da execução de testes com amostras contaminadas artificialmente com o padrão de AFB1, pode-se confirmar que o método adotado ao ser modificado é capaz de extrair e quantificar a aflatoxina B1 em rações para animais, visto que todos os testes efetuados apresentaram as mesmas marcas azuis-fluorescentes com Fator de Retenção (Rf) igual ao do padrão aplicado diretamente na cromatoplaça, como exposto na **Figura 1**.

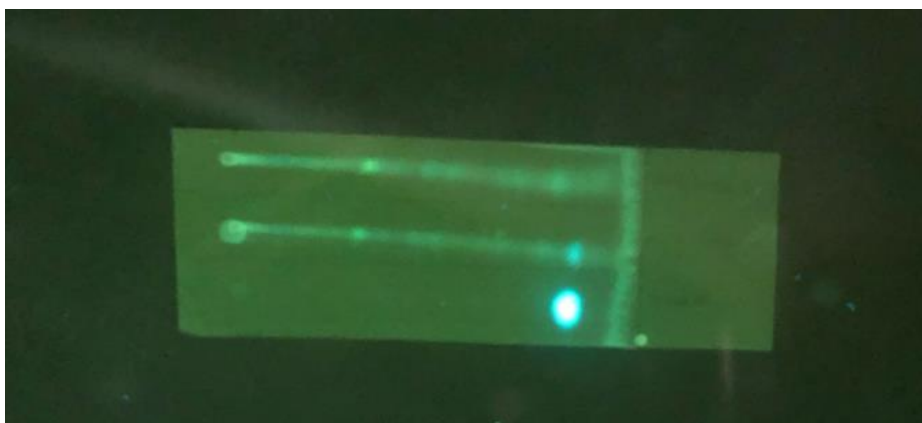


Figura 1: Teste de validação do método com amostra de ração artificialmente contaminada sob luz UV. **Fonte:** Compilação do autor.

Quanto ao método de confirmação com ácido sulfúrico a 25%, pode-se inferir que ambos - amostra contaminada artificialmente e padrão - apresentaram mudança de fluorescência para amarelo-esverdeado, indicando que o método é confirmatório para a aflatoxina B1 utilizada, visto na **Figura 2**.

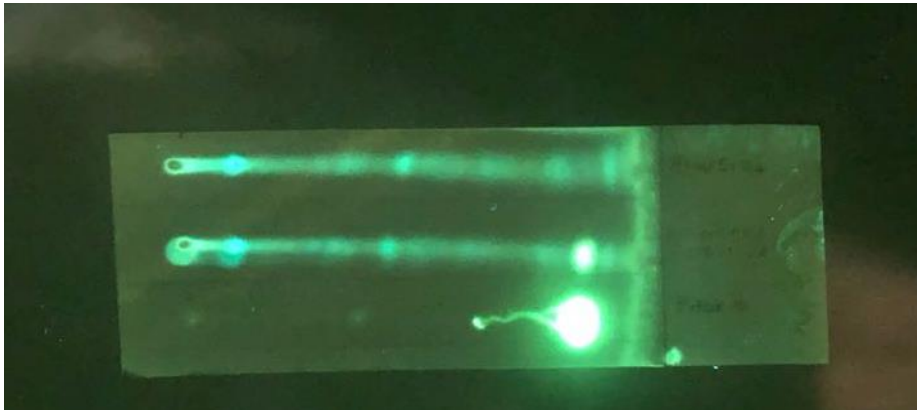


Figura 2: Teste de validação do método com amostra de ração artificialmente contaminada sob luz UV com ácido sulfúrico 25%. **Fonte:** Compilação do autor.

As amostras, analisadas em duplicata com o intuito de confirmar o resultado negativo ou positivo sobre a presença de AFB1, se mostraram concordantes para todas as doze alíquotas que representaram as seis amostras utilizadas nesse estudo. Todas as rações foram submetidas ao mesmo teste qualitativo, e, independente do resultado apresentado durante a CCD empregada, foram também avaliadas no processo de revelação química utilizando o ácido sulfúrico a 25%.

Em relação às análises referentes ao período úmido e seco, constatou-se que as rações não apresentaram manchas com Rf e características iguais ao exposto pela solução-padrão, indicando, portanto, não serem AFB1. Além disso, os resultados foram confirmados ao pulverizar a solução de ácido sulfúrico 25%, os quais não apresentaram a mudança de coloração das manchas exibidas na cromatoplaça (**Quadro 1**).

Quadro 1: Resultados das análises de amostras de rações para cães e gatos por CCD e revelação com ácido sulfúrico 25%.

TIPOS DE AMOSTRAS ANALISADAS			RESULTADOS	
			PRESENÇA DE CONTAMINAÇÃO POR AFB1 EM ANÁLISE SOB LUZ UV	CONFIRMAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO POR AFB1 COM ÁCIDO SULFÚRICO 25%
PERÍODO ÚMIDO	RAÇÃO PARA CÃES	ALTO CUSTO	ND	ND
		BAIXO CUSTO	ND	ND
	RAÇÃO PARA GATOS	ALTO CUSTO	ND	ND
		BAIXO CUSTO	ND	ND
	RAÇÃO PARA PÁSSAROS	ALTO CUSTO	ND	ND
		BAIXO CUSTO	ND	ND
PERÍODO SECO	RAÇÃO PARA CÃES	ALTO CUSTO	ND	ND
		BAIXO CUSTO	ND	ND
	RAÇÃO PARA GATOS	ALTO CUSTO	ND	ND
		BAIXO CUSTO	ND	ND
	RAÇÃO PARA PÁSSAROS	ALTO CUSTO	ND	ND
		BAIXO CUSTO	ND	ND

ND: não detectado.

Fonte: Compilação do autor.

Dessa forma, pode-se inferir que as amostras não apresentaram sinais evidentes de contaminação por aflatoxinas B, em específico a AFB1, a qual foi utilizada como padrão nos experimentos descritos. Ao que concerne o surgimento de manchas com formatos distintos ao manifestado pelo padrão utilizado em algumas das amostras, pode-se afirmar também que não há evidências da presença de AFB2, visto que ambas as micotoxinas (AFB1 E AFB2) apresentam manchas azuis fluorescentes, as quais quando em contato com a solução, reagem com esta e manifestam manchas de cor amarelo-esverdeado fluorescente. Desse modo, é possível afirmar que as manchas diversas podem ser decorrentes da própria composição das rações avaliadas ou de um contaminante diferente das aflatoxinas, com capacidade de emitir fluorescência azul, como demonstrado nas **Figuras 3-4**.

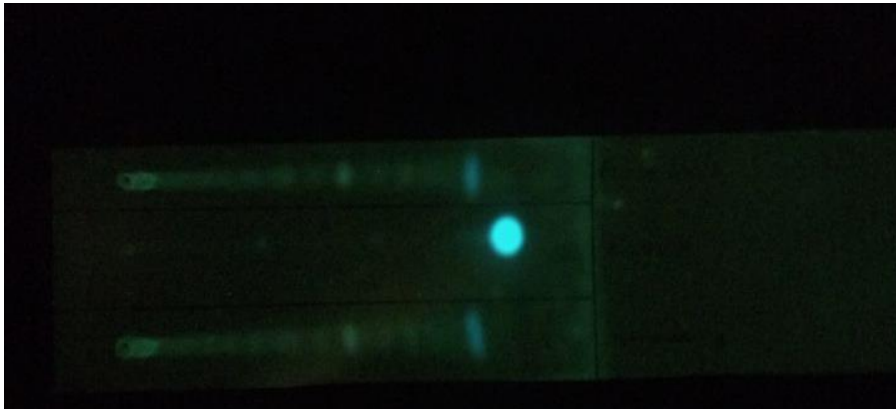


Figura 3: CCD de amostra de ração para gatos (baixo custo) sob UV - período úmido. **Fonte:** Compilação do autor.

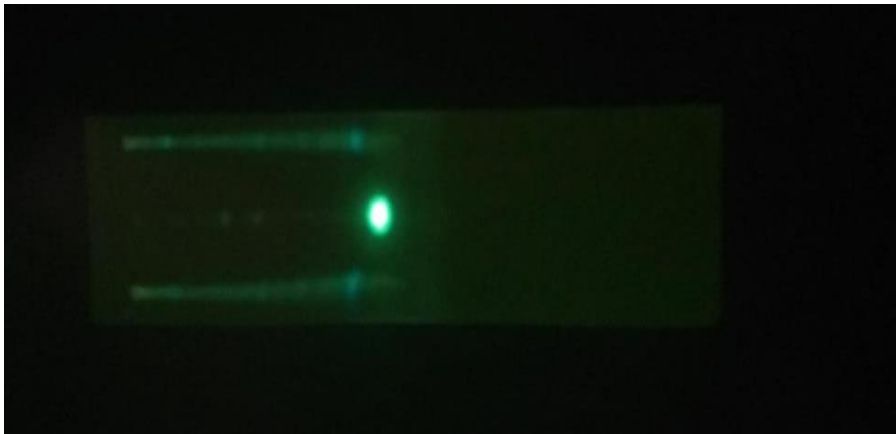


Figura 4: CCD de amostra de ração para gatos (baixo custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período úmido. **Fonte:** Compilação do autor.

OLDONI, ROSA, & TEIXEIRA (2012) realizaram análises micotoxicológica e micológica de 27 amostras de rações e apresentou resultado positivo para a presença de fungos em 26 destas, entre eles, o *Aspergillus flavus* (22,2%). Apesar de observar-se a ocorrência de diversos fungos nas amostras desse estudo, ao aplicar a técnica de CCD com o objetivo de detectar as micotoxinas produzidas por estes, foi identificado em apenas 2 amostras a contaminação por deoxinivalenol. Nas amostras que continham o *Aspergillus flavus* não foi detectado micotoxinas.

Contudo, não se pode afirmar que há risco zero de contaminação apesar do resultado mostrado ser negativo, tendo em vista que NEVES e colaboradores (2009)

mostraram que, em concentrações muito baixas, a CCD não é capaz de detectar a presença da aflatoxinas, necessitando, portanto, de um método com maior sensibilidade.

Em estudo realizado por SHARMA & MÁRQUEZ (2001), analisou-se um total de 35 amostras de rações, as quais 19 eram para cães e 16 para gatos. Por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), demonstrou-se que 79% das amostras de rações de cães estavam contaminadas com aflatoxinas, enquanto que as para gatos 100% evidenciaram a presença dessa micotoxina. Ainda, a pesquisa expôs que a AFB1 foi a mais recorrente nas análises.

OLIVER e colaboradores (2018) descreveram os principais métodos utilizados na detecção de micotoxinas, sendo estes a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG). Ainda, apresenta também que a CCD vem sendo substituída pela CLAE, que proporcionaria uma alta especificidade e sensibilidade para essa abordagem, o que justificaria a diferença entre resultados obtidos na literatura e no presente estudo.

Todavia, utilizá-la como técnica de triagem ainda é uma escolha viável pela sua facilidade de execução, capacidade de reproduzir resultados qualitativos e/ou semi-quantitativos e por seu baixo custo (IAMANAKA, 2010).

Além disso, é possível elencar fatores que não podem ser controlados na pesquisa. Entre eles, enquadra-se o armazenamento feito no local de aquisição das amostras, que apesar de serem comercializadas de forma aberta, não contribuiu para o desenvolvimento de fungos e, conseqüentemente, a produção de micotoxinas. Esse armazenamento pode ser influenciado pela rotatividade do produto nesse estabelecimento, visto que produtos de alto giro comercial não ficariam expostos por muito tempo nessas condições favoráveis ao crescimento fúngico, impedindo, portanto, a contaminação. Esta situação corrobora com KANA e colaboradores (2013), que afirma em seu estudo que a suscetibilidade dos alimentos às infecções fúngicas é proporcional ao tempo de armazenamento.

Os resultados descritos aqui corroboram com o que foi estudado por MAIA & SIQUEIRA (2002), onde se utilizaram de 45 amostras de rações para cães e 25 amostras de rações para gatos e obtiveram como desfecho que apenas 4 amostras estavam contaminadas, com incidência de 6,7% e 4% para cada tipo, respectivamente. Ainda, após a quantificação, conclui-se que as 4 amostras mesmo contaminadas, não ultrapassaram os limites estabelecidos pela legislação brasileira. Nessa pesquisa, justificou-se que os baixos índices de contaminação podem ter sido influenciados pela utilização de fungicidas na própria formulação pelas indústrias, como o sulfato de cobre, o

que inibiria o desenvolvimento dos fungos e a produção de micotoxinas. Portanto, esse fator também pode estar interligado aos resultados negativos deste trabalho.

DIAS (2018) destacou em estudo algumas substâncias capazes de inativar a ação das micotoxinas em matérias-primas da produção de rações, como os cereais. Dentre as substâncias mencionadas estão a amônia, hidróxido de sódio, formaldeído e metilaminas, que são substâncias que podem ser utilizadas pela indústria a fim de evitar danos à saúde animal.

4 CONCLUSÃO

Através dos experimentos realizados neste estudo não foi identificada a presença de AFB1 em amostras de rações destinadas a alimentação de cães, gatos e pássaros comercializadas na cidade de Natal/RN/Brasil. Apesar disso, é legítimo concluir que é indispensável à adoção de metodologias mais sensíveis, devido as limitações apresentadas pelo método empregado, bem como a utilização de mais padrões de comparação. Também é imprescindível a utilização de uma amostragem maior, o que aumentaria a representatividade dos resultados quanto à população.

REFERÊNCIAS

- ABINPET. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. “**Em 2014, setor pet cresceu 10% sobre 2013 e atingiu um faturamento de R\$ 16,7 bilhões no Brasil**”. 2014. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/em-2014-setor-pet-cresceu-10-sobre-2013-e-atingiu-um-faturamento-de-r-167-bilhoes-no-brasil/>>. Acesso em: 27 de julho de 2019.
- ABINPET. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. “**2020: Mercado PET Brasil**”. 2020. Disponível em: <http://abinpet.org.br/wp-content/uploads/2020/06/abinpet_folder_2020_draft3.pdf>. Acesso em: 04 de outubro de 2020.
- AOAC. International Official Methods of Analysis. v. 2, n. 16, p. 2-28, 1999.
- BŁAJET-KOSICKA, A. et al. Determination of moulds and mycotoxins in dry dog and cat food using liquid chromatography with mass spectrometry and fluorescence detection. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 7, n. 4, p. 302-308, jun, 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19393210.2014.933269>>. Acesso em: 27 de julho de 2019.
- BOTURA, Mariana B. et al. Otimização de metodologia por CCD para determinação de aflatoxina M1 em leite de cabra e investigação de sua ocorrência no Estado da Bahia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 64, n. 2, p. 193-199, dez, 2005. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552005000200008&lng=p&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 28 de agosto de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 16 out. 2002. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/res0274_15_10_2002.html>. Acesso em: 03 de outubro de 2020.

BUGNO, Adriana. **Drogas vegetais: avaliação da contaminação microbiana e pesquisa de aflatoxinas, ocratoxina A e citrulina**. 2006. Tese (Doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-25082008-101633/en.php>>. Acesso em: 28 de agosto de 2018.

BULLERMAN, Lloyd B.; BIANCHINI, Andreia. Stability of mycotoxins during food processing. **International journal of food microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 140-146, out, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160507003984>>. Acesso em: 28 de agosto de 2018.

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. (Eds.). **Mycotoxins and Phytoalexins**. London: CRC Press, 1991. p. 103-144.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems**. Council for Agricultural, 2003.

DE LOS ALIMENTOS-CARACTERÍSTICAS, ICMSF Microorganismos. de los patógenos microbianos. **Editorial ACRIBIA SA Zaragoza-España**, v. 1, p. 996, 1996.

DIAS, Anderson Silva. Micotoxinas em produtos de origem animal. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 30, jan, 2018. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/2d0q7unkplade0w_2018-7-10-8-20-59.pdf>. Acesso em: 24 de outubro de 2020.

DINIZ, S.P.S.S. Micotoxinas. 1 ed. Campinas: Editora Rural, 2002. p. 181.

DOCE. Regulamento (CE) n.1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006. Os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. 2006. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/ALL/?uri=celex:32006R1881>>. Acesso em: 24 de outubro de 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003**. Rome, Italy: FAO, Food Quality and Standards Service, 2004. FAO Food and Nutrition Paper 81.

FORBES BRASIL. **“Brasil torna-se o segundo maior mercado de produtos pet”**. 2020. Disponível em: <<https://forbes.com.br/negocios/2020/08/brasil-torna-se-o-segundo-maior-mercado-de-produtos-pet/>>. Acesso em: 04 de outubro de 2020.

FREIRE, Francisco das Chagas Oliveira et al. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. 1 ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/10830/1/Dc-110.pdf>>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

GONÇALVES, B; SANTANA, L & PELEGRINI, P. Micotoxinas: Uma revisão sobre as principais doenças desencadeadas no organismo humano e animal. **Revista de Saúde da Faciplac**, v. 4, n. 1, 2017.

Disponível em: <<http://revista.faciplac.edu.br/index.php/RSF/article/view/226>>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

IAMANAKA, B. T. et al. Micotoxinas em alimentos. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, v. 7, p. 138-161, 2013. Disponível em: <<http://www.journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/view/128>>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

IARC (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 82: 1–556.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. **Normais Climatológicas do Brasil – Gráficos Climatológicos 1981 a 2010**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisClimatologicas>>. Acesso em 27 de agosto de 2018.

KANA, Jean Raphaël et al. Assessment of Aflatoxin Contamination of Maize, Peanut Meal and Poultry Feed Mixtures from Different Agroecological Zones in Cameroon. **Toxins**, v. 5, n. 5, p. 884-894, maio, 2013. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/2072-6651/5/5/884/htm>>. Acesso em: 04 de outubro de 2020.

MAIA, P. Penido; PEREIRA BASTOS DE SIQUEIRA, M. E. Occurrence of aflatoxins B 1, B 2, G 1 and G 2 in some Brazilian pet foods. **Food Additives & Contaminants**, v. 19, n. 12, p. 1180-1183, jun, 2002. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0265203021000011214>>. Acesso em: 06 de agosto de 2018.

MAIA, Patrícia Penido; DE SIQUEIRA, Maria Elisa Pereira Bastos. Aflatoxinas em rações destinadas a cães, gatos e pássaros—Uma revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, 2007. Disponível em: <<https://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/2491>>. Acesso em: 06 de agosto de 2018.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I.; Toxicologia de Alimentos. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda, 2000.

NEVES, J. A.; SILVA, R. A.; OLIVEIRA, L. R.; BATISTA, R. D. S. R. Determinação da presença de aflatoxinas em castanhas de caju. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 15, n. 1, p. 39-44, mar, 2009. Disponível em: <<https://revistas.apps.uepg.br/index.php/exatas/article/view/973>> Acesso em: 06 de agosto de 2018.

OLDONI, M. L.; ROSA, A. D.; TEIXEIRA, M. L. Análises micotoxicológicas em rações comercializadas no oeste de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 14, n. 4, p. 373-379, 2012. Disponível em: <<http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev144/Art1448.pdf>>. Acesso em: 04 de outubro de 2020.

OLIVER, Melissa Evelyn Cunha et al. Micotoxinas e micotoxicoses na suinocultura: revisão de literatura. **Nutritime Revista Eletrônica**, v.17, n.2, p. 8709-8716, mar/abr, 2020. Disponível em: <<https://www.nutritime.com.br/site/wp-content/uploads/2020/03/Artigo-514.pdf>>. Acesso em: 04 de outubro de 2020.

ROCHA, Miguel Divino da et al. Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil. **Rev Bras Toxicol**, v. 21, n. 1, p. 15-9, jan, 2008. . Disponível em:

<<http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/lilacs/revbrastoxicol/2008v21n1/revbrastoxicol2008v21n1p15-19.pdf>>.

Acesso em: 27 de junho de 2018.

SEKIYAMA, Beatriz Leiko et al. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 289-294, set, 2005. Disponível em:

<https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822005000300016&script=sci_arttext>. Acesso em: 27 de junho de 2018.

SHAO, Manyu et al. Mycotoxins in commercial dry pet food in China. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 11, n. 4, p. 237-245, maio, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19393210.2018.1475425>>. Acesso em: 27 de junho de 2018.

SHARMA, M.; MÁRQUEZ, C. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. **Animal Feed Science and Technology**, v.93, p.109-114, set, 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840101002747>>. Acesso em: 27 de junho de 2018.

SILVA, Juliana Lúcia da et al. Ocorrência de aflatoxinas em feijões comercializados no Mercado varejista de Goiânia-GO. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 32, n. 2, p. 109-114, jul/dez, 2002. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/index.php/pat/article/view/2421>>. Acesso em: 27 de junho de 2018.

SOARES, L. M.; 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-Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, Jan-Fev, 1989. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/72/1/22/5690864>>. Acesso em: 27 de junho de 2018.

TAHIRA, Iffat; SULTANA, Nighat; HANIF, Nafeesa Qudsia. Identification of aflatoxins and ochratoxin a in selected imported pet food. **Journal of Bioresource Management**, v. 2, n. 1, p. 5, mar, 2015. Disponível em: <<https://corescholar.libraries.wright.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1021&context=jbm>>. Acesso em: 27 de junho de 2018.

TEIXEIRA, A. da S. et al. Análise e quantificação de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de castanha-do-Brasil. In: **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. Revista de Ciências da Vida, Seropédica, v. 28, p. 22-24, 2008. Suplemento. Edição do XIII Encontro Nacional de Micotoxinas, Rio de Janeiro, ago. 2008. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/416880/1/2008224.pdf>>. Acesso em: 06 de agosto de 2018.

ZLOTOWSKI, Priscila et al. Surto de aflatoxicose em suínos no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, RJ. Vol. 24, n. 4 (out./dez. 2004), p. 207-210, out/dez, 2004. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/pvb/v24n4/a07v24n4.pdf>>. Acesso em: 27 de julho de 2019.

ANEXOS

Anexo 1: Normas de publicação da revista REVINTER - REVISTA INTERTOX DE TOXICOLOGIA, RISCO AMBIENTAL E SOCIEDADE.

Diretrizes para Autores

A revista, sendo veículo de registro e divulgação científica, tem por objetivo a publicação de artigos e revisões de literatura na área de Ciências Toxicológicas e Ambientais com impactos sobre sociedades. Os trabalhos devem se enquadrar nas seguintes categorias:

- a) Relato de pesquisa:** pesquisa científica baseada em dados experimentais, utilizando método científico
- b) Estudo teórico:** análise de construtos teóricos, levando ao questionamento de modelos existentes e à elaboração de hipóteses para futuras pesquisas;
- d) Revisão crítica da literatura:** análise de um corpo abrangente de artigos científicos relativos a assuntos de interesse nas áreas temáticas;
- e) Comunicação breve:** relato de pesquisa sucinto, porém completo, de uma investigação específica ou de um caso pericialmente relevante;
- f) Carta ao editor:** avaliação crítica de conteúdo publicado na Revinter ou resposta de autores à crítica formulada a artigo de sua autoria;
- h) Resenha:** revisão crítica de obra publicada recentemente, orientando o leitor quanto a suas características e usos potenciais.

I. Os idiomas aceitos nas submissões são português, inglês e espanhol. Sendo necessário que o título dos artigos e o resumo contem com uma versão em língua estrangeira;

II. A temática das sessões aceitas nas submissões são: Farmacologia, Toxicologia, Agronomia, Medicina, Saúde Coletiva e Biodiversidade (Ecologia, oceanografia, botânica e zoologia).

FORMATO

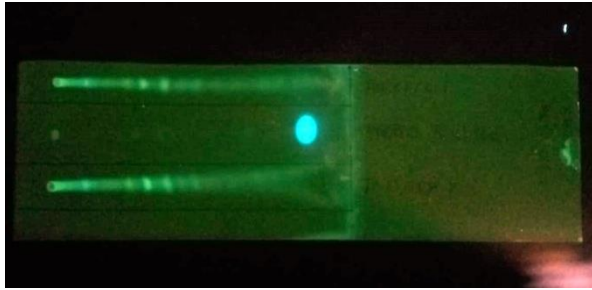
Os artigos devem ser submetidos em formato .doc, .docx ou similares (pdf não será aceito); fonte tamanho 12 (com exceção para citações de mais de três linhas, notas de rodapé e legendas de ilustrações) e espaçamento 1,5. O documento deve seguir as normas:

- 1) NBR 6024 - Numeração Progressiva;
- 2) NBR 6022 - Artigo em Publicação Periódica Científica;
- 3) NBR 10520 - Citações em Documentos;
- 4) NBR 6023 - Elaboração de Referências.

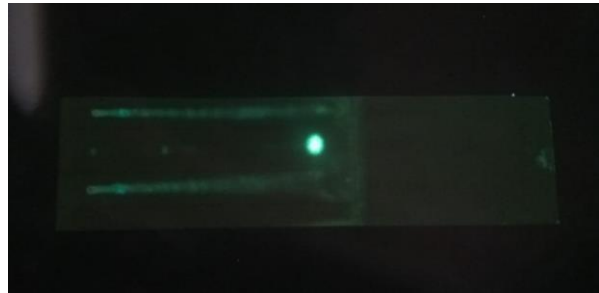
Todos os metadados devem ser preenchidos corretamente com as informações pessoais dos autores, não deve haver nenhuma identificação de autoria no artigo devido a avaliação duplo-cega.

As submissões são realizadas diretamente pela plataforma OJS no link: <http://autores.revistarevinter.com.br/index.php?journal=toxicologia&page=submission&op=wizard>

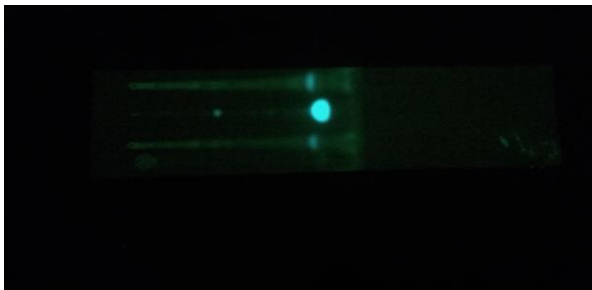
Anexo 2: Imagens dos experimentos sob luz UV.



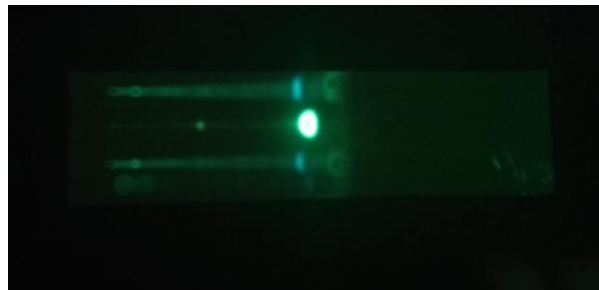
a) CCD de amostra de ração para cães (alto custo) sob UV - período úmido. **Fonte:** compilação do autor.



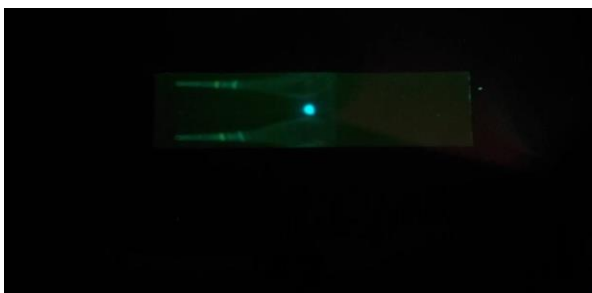
b) CCD de amostra de ração para cães (alto custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período úmido. **Fonte:** compilação do autor.



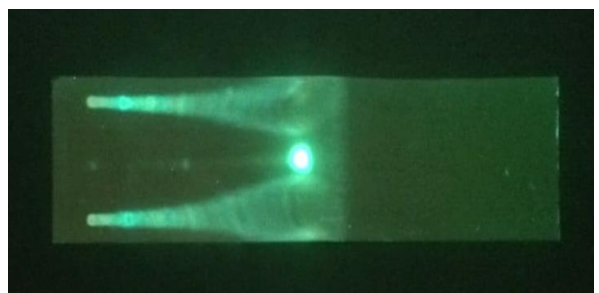
c) CCD de amostra de ração para cães (baixo custo) sob UV - período úmido. **Fonte:** compilação do autor.



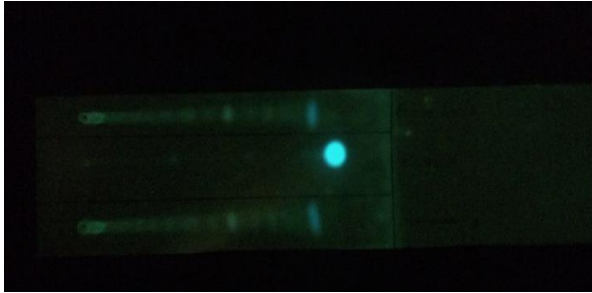
d) CCD de amostra de ração para cães (baixo custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período úmido. **Fonte:** compilação do autor.



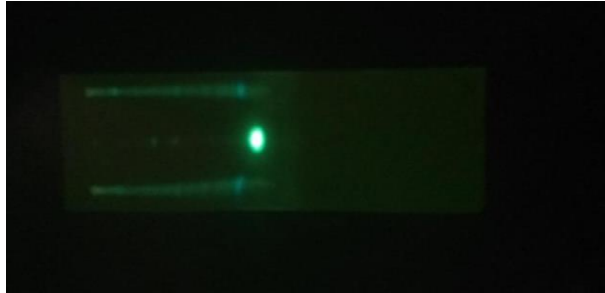
e) CCD de amostra de ração para gatos (alto custo) sob UV - período úmido. **Fonte:** compilação do autor.



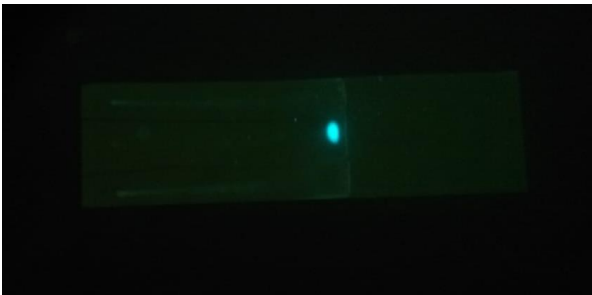
f) CCD de amostra de ração para gatos (alto custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período úmido. **Fonte:** compilação do autor.



g) CCD de amostra de ração para gatos (baixo custo) sob UV - período úmido. **Fonte:** compilação do autor.



h) CCD de amostra de ração para gatos (baixo custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período úmido. **Fonte:** compilação do autor.



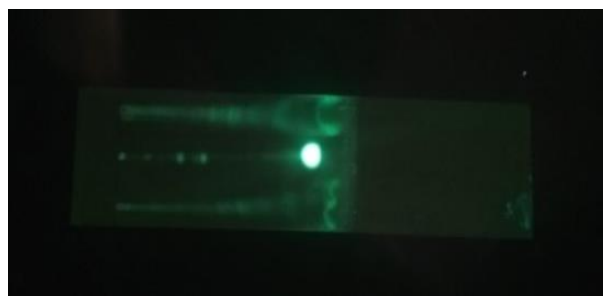
i) CCD de amostra de ração para pássaros (alto custo) sob UV - período úmido. **Fonte:** compilação do autor.



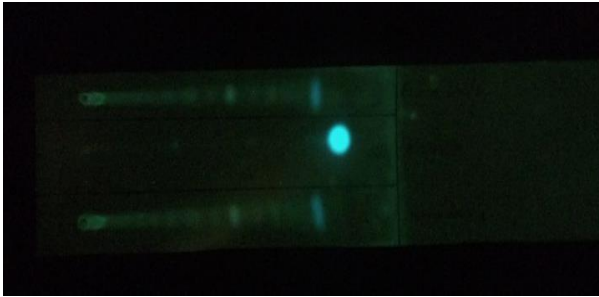
j) CCD de amostra de ração para pássaros (alto custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período úmido. **Fonte:** compilação do autor.



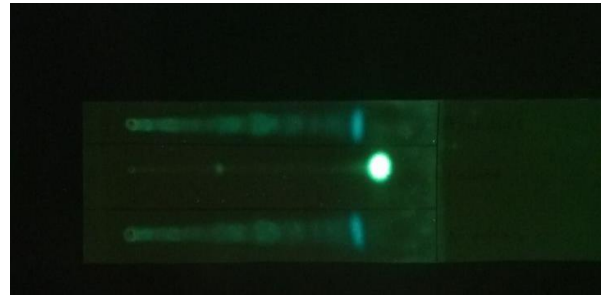
k) CCD de amostra de ração para pássaros (baixo custo) sob UV - período úmido. **Fonte:** compilação do autor.



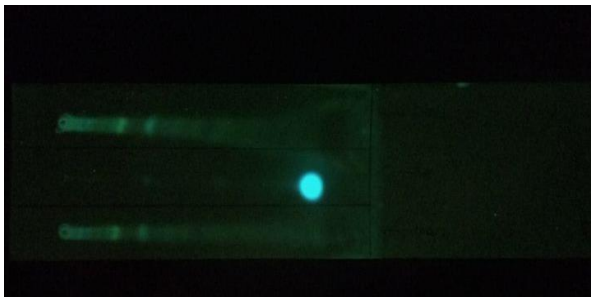
l) CCD de amostra de ração para pássaros (baixo custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período úmido. **Fonte:** compilação do autor.



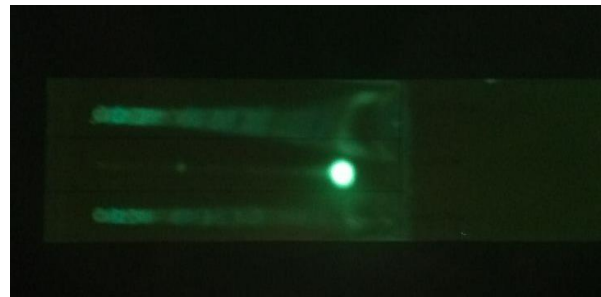
m) CCD de amostra de ração para cães (alto custo) sob UV - período seco. **Fonte:** compilação do autor.



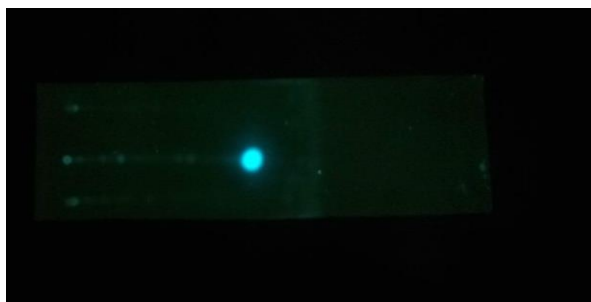
n) CCD de amostra de ração para cães (alto custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período seco. **Fonte:** compilação do autor.



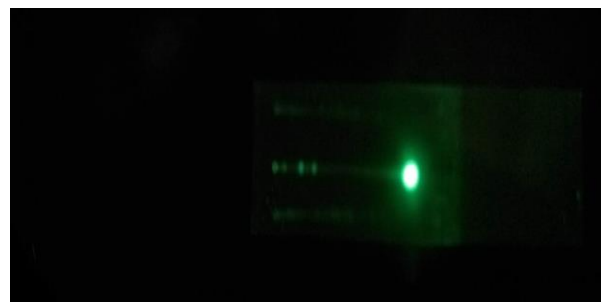
o) CCD de amostra de ração para cães (baixo custo) sob UV - período seco. **Fonte:** compilação do autor.



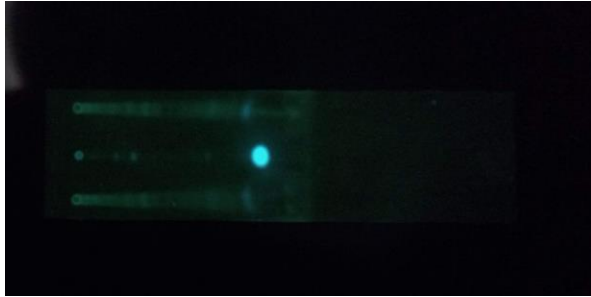
p) CCD de amostra de ração para cães (baixo custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período seco. **Fonte:** compilação do autor.



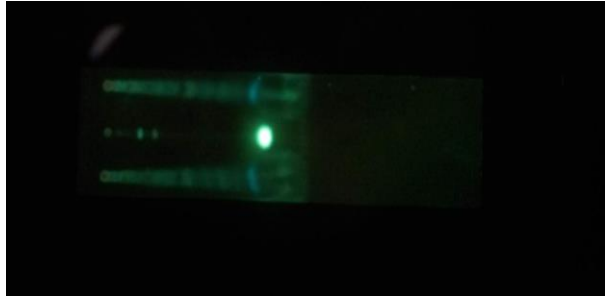
q) CCD de amostra de ração para gatos (alto custo) sob UV - período seco. **Fonte:** compilação do autor.



r) CCD de amostra de ração para gatos (alto custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período seco. **Fonte:** compilação do autor.



s) CCD de amostra de ração para gatos (baixo custo) sob UV - período seco. **Fonte:** compilação do autor.



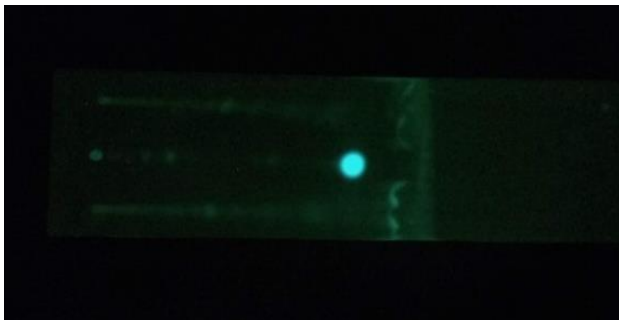
t) CCD de amostra de ração para gatos (baixo custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período seco. **Fonte:** compilação do autor.



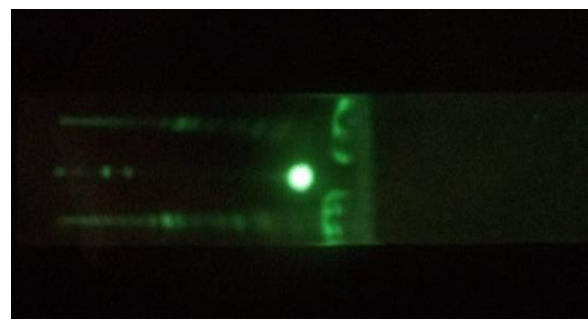
u) CCD de amostra de ração para pássaros (alto custo) sob UV - período seco. **Fonte:** compilação do autor.



v) CCD de amostra de ração para pássaros (alto custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período seco. **Fonte:** compilação do autor.



x) CCD de amostra de ração para pássaros (baixo custo) sob UV - período seco. **Fonte:** compilação do autor.



z) CCD de amostra de ração para pássaros (baixo custo) sob UV após pulverização com ácido sulfúrico 25% - período seco. **Fonte:** compilação do autor.