

Ocorrência de fungos de campo e de armazenamento em ingredientes e ração para tambaqui(*Colossoma macropomum*)¹

Andrea Georgia Souza de Araújo

Universidade Federal de Alagoas, Zootecnista, UFAL BR 104 NORTE 85 – MATA DO ROLO – 57100 – 000 – Rio Largo, AL – Brasil E – mail:

Tania Marta Carvalho dos Santos

Prof^a. Dr^a. UFAL Universidade Federal de Alagoas BR 104 NORTE 85 – MATA DO ROLO – 57100 – 000 – Rio Largo, AL – Brasil E – mail:

Afonso Marinho Espíndola Filho

Prof. Msc. UFAL Universidade Federal de Alagoas BR 104 NORTE 85 – MATA DO ROLO – 57100 – 000 – Rio Largo, AL – Brasil E – mail:

Ana Karina de Aguiar Calheiros

Universidade Federal de Alagoas. Zootecnista, UFAL BR 104 NORTE 85 – MATA DO ROLO – 57100 – 000 – Rio Largo, AL – Brasil E – mail:

Yamina Coentro Montaldo

Universidade Federal de Alagoas. Zootecnista, UFAL BR 104 NORTE 85 – MATA DO ROLO – 57100 – 000 – Rio Largo, AL – Brasil E – mail:

1. Trabalho de Conclusão de Curso do 1º Autor
2. Agradecimentos a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas-FAPEAL

1 - RESUMO

O controle do desenvolvimento microbiano em rações utilizadas na alimentação animal é uma maneira de manter a qualidade higiênico-sanitário e desse modo prevenir o surgimento de alterações indesejáveis. O presente trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de fungos de campo e de armazenamento em uma ração para peixe e seus constituintes, e detectar o nível de contaminação por fungos de campo e de armazenamento em: amostras de farelo de milho e soja e, farinha de algaroba e o suplemento mineral vitamínico (PREMIX), utilizados na formulação de uma ração para peixes, e em amostras da mesma, armazenadas 0, 30,60 e 90 dias. Os experimentos foram conduzidos no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas no laboratório de Microbiologia Agrícola. A ração e seus constituintes foram fornecidos pelo laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos. Para isolamento dos fungos foi utilizado o método das diluições em série seguido de semeadura em placas de Petri contendo meio de cultura e incubação no escuro a 28°C, quando foi calculado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Entre os constituintes o maior número de UFC foi detectado no Premix e Farinha de algaroba (respectivamente $4,41 \times 10^4$ e $4,36 \times 10^4$) que não diferiram estatisticamente entre si. Com relação% de algaroba adicionada à ração, o maior número de UFC foi encontrado foi observado no tratamento 0% e o menor com 50%. Com relação ao tempo de armazenamento o maior número de UFC ocorreu no tempo 0 e o menor aos 30 dias. Considerando-se a interação entre os dois fatores verifica-se que o maior número de UFC ocorreu no tempo 0 para tratamento sem farinha de algaroba ($7,37 \times 10^4$) enquanto que o menor foi detectado ao 30 dias de armazenamento para 50 e 100% de algaroba adicionada ($1,52 \times 10^4$). Foram identificados os fungos de campo *Cladosporium* e *Bipolaris*, e *Aspergillus* e *Penicillium* de armazenamento.

Palavras-chave: fungos de campo, fungos de armazenamento, rações para peixe

Occurrence of field fungi and storage and feed ingredients for tambaqui (*Colossoma macropomum*)

ABSTRACT

The control of microbial growth in feed used in animal feed is a way of maintaining quality hygienic and thereby prevent the emergence of undesirable changes. The present work aims to verify the occurrence of field fungi and storage in a fish and feed for their constituents, and to detect the level of contamination by field fungi and storage: samples of corn bran and soybean, mesquite flour, vitamin and mineral supplement (PREMIX) used in formulating a ration for fish, and in the same samples, stored, 0, 30.60 and 90 days. The

experiments were conducted at the Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, in the laboratory of Agricultural Microbiology. Ration and its constituents were supplied by the Laboratory of Nutrition of Aquatic Organisms. For isolation of fungi was used the method of serial dilutions followed by seeding in Petri dishes containing culture medium and incubated in darkness at 28°C, when calculated the number of Colony Forming Units (CFU). Among the constituents the greatest number of CFU was detected in Premix and mesquite flour (respectively 4.41×10^4 and 4.36×10^4) did not differ statistically among themselves. Regarding % mesquite added to the diet, the highest number of CFU was found among the patients treated 0% and the lowest with 50%. With respect to storage time the greatest number of CFU at time 0 was the lowest at 30 days. Considering the interaction between the two factors it appears that the greatest number of CFU occurred at time 0 for treatment without mesquite flour (7.37×10^4) while the lowest was detected at 30 days of storage for 50 and 100% added mesquite (1.52×10^4). We identified the field fungi *Bipolaris* and *Cladosporium*, *Aspergillus* and *Penicillium* and storage.

Keywords: Field of fungi, storage off ungi, ration for fish.

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos em geral são muito sensíveis à contaminação e a proliferação de fungos, principalmente aqueles que apresentam contaminação natural veiculada pelo ar e pelo solo. Os danos ocasionados por fungos são muitas vezes desconsiderados até alcançarem proporções alarmantes. Esses microrganismos não causam apenas perdas diretas como também pode ameaçar a saúde do homem e de animais, através das micotoxinas, que são metabólitos secundários, sintetizados no final da fase exponencial do crescimento de alguns fungos.

A qualidade higiênico-sanitária das rações corresponde a uma medida de controle para o desenvolvimento de patógenos, já que constitui uma parte integrante muito importante na cadeia alimentar que se estende da alimentação animal até o consumidor.

Análises feitas pelo Instituto Biológico da São Paulo no período de 1989-1999, em 728 amostras de alimentos, revelaram que 18% apresentavam contaminação por micotoxinas. Dessas amostras 338 eram de rações para animais de criação e domésticos das quais 17% estavam contaminadas por uma ou várias micotoxinas, em teores variáveis, com alguns destes valores fora dos limites estabelecidos pela legislação (Gonzalez et al., 2001).

As fontes de contaminação por fungos são diversas: na fase de produção, na colheita, no manuseio e no processamento. Esses microrganismos são frequentemente divididos em dois grupos: fungos do campo, que infectam o produto ainda no campo e fungos de armazenamento, que invadem o mesmo pouco antes e durante o armazenamento.

Os principais gêneros são *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Helminthosporium*, *Nigrospora*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma* que invadem grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita. Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas. Causam danos ao produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto. Os fungos do gênero *Aspergillus* (*A. halophilicus*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. alutaceus* (*A. ochraceus*) e *A. flavus*) e os do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. verrucosum*) são os indicadores de deterioração em sementes e grãos causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os

primeiros estágios da deterioração microbiológica (Sinha & Sinha 1992; Miller,1995; Márcia & Lázari, 1998; Pinto, 1998).

O desenvolvimento de fungos pode ocorrer se: o grão foi armazenado antes de ter sido seco suficientemente, o grão foi danificado durante a colheita, manipulação. Ao passo que na armazenagem podem ocorrer os seguintes danos: perda do valor nutritivo, descoloração do grão, redução de germinação, calcinação de grãos, aumento da temperatura do produto armazenado até o ponto de combustão espontânea, cheiro e sabor mofento formação de micotoxinas, criação de um ambiente adequado para o desenvolvimento de espécies de insetos especiais (indicadores de grão de baixa qualidade)

A contagem padrão em placa (PCA) tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também idéia sobre seu tempo útil de conservação. Sua presença em grande número indica matéria prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção e condições inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos.

Considerando a importância do controle microbiológico e contaminações/adulterações de rações e ingredientes de rações, o presente estudo objetivou avaliar nível de contaminação por fungos de campo e de armazenamento em: amostras de farelo de milho e soja e, farinha de algaroba e o suplemento mineral vitamínico (PREMIX), que foram utilizados na formulação de uma ração para peixes, e em amostras da mesma, armazenadas a 0, 30,60 e 90 dias, por meio da pesquisa de fungo indicadores de contaminação em campo e armazenamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os microrganismos estão intimamente associados com a disponibilidade, a abundância e a qualidade do alimento para consumo humano. Alimentos são facilmente contaminados com microrganismos na natureza, durante manipulação e processamento. Após ter sido contaminado, o alimento serve como meio para o crescimento de microrganismos. Se esses microrganismos tiverem condições de crescer, podem mudar as características físicas e químicas do alimento e podem causar sua deterioração. Os microrganismos no alimento podem também ser responsáveis por intoxicações e infecções transmitidas por alimentos (Pelczar Jr. et al, 1997).

O conhecimento cada vez mais amplo da transmissão de doenças através dos alimentos tem determinado que um número cada vez maior de países considere a necessidade de submeter estes produtos a certas provas ou estudos destinados a avaliar sua inocuidade e sua qualidade. Conseqüentemente, com esta necessidade muitas técnicas têm sido desenvolvidas (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1984).

A presença de microrganismos em alimentos não significa necessariamente um risco para o consumidor ou uma qualidade inferior destes produtos. Excetuando-se um número reduzido de produtos submetidos à esterilização comercial, os diferentes alimentos podem conter bolores, leveduras, bactérias e outros microrganismos. Muitos alimentos tornam-se potencialmente perigosos ao consumidor somente quando os princípios de sanitização e higiene são violados. Se o alimento tem estado sujeito a condições que poderiam permitir a entrada e/ou crescimento de agentes infecciosos ou toxigênicos, pode se tornar um veículo de transmissão de doenças (ICMSF, 1984).

Microrganismos indicadores são, segundo Franco & Eandgraf (1996), grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

Como exemplos de microrganismos indicadores podem ser citados aqueles que, segundo a ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), podem ser agrupados em:

1. Microrganismos que não oferecem um risco direto à saúde: contagem padrão de mesófilos, contagem de psicrotróficos e termófilos, contagem de bolores e leveduras.

2. Microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde: coliformes totais, coliformes fecais, enterococos, enterobactérias totais, *Escherichia coli*.

Bolores são os fungos filamentosos, multicelulares, podendo estar presentes no solo, no ar, na água e em matéria-orgânica em decomposição. (Siqueira, 1995).

A presença de fungos e leveduras viáveis e em índice elevado nos alimentos pode fornecer várias informações, tais como, condições higiênicas deficientes de equipamentos, multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e/ou estocagem e matéria-prima com contaminação excessiva (Siqueira, 1995).

A ração é uma mistura de uma série de ingredientes, com a finalidade de suprir as necessidades de manutenção e crescimento dos animais; no caso dos peixes, que são monogástricos, sua composição provém basicamente do milho e da soja, além de adicionar as vitaminas fundamentais, os aminoácidos essenciais, sais minerais necessários e outros aditivos importantes (autor). O controle do desenvolvimento microbiano em rações utilizadas na alimentação animal visa principalmente diminuir os riscos à saúde dos consumidores de carnes. Assim, a qualidade higiênico-sanitária é uma maneira de prevenir ou retardar o surgimento de alterações indesejáveis na ração, controlando os agentes patogênicos, já que constitui uma parte integrante muito importante na cadeia alimentar que se estende do animal até o consumidor (ICMSF, 1981).

A qualidade das rações começa pelo controle da matéria-prima que vai ser utilizada e a escolha dos tipos de ingredientes que serão utilizados para a confecção da mesma. Para garantir a melhor alimentação dos peixes, deve-se atentar para os riscos no armazenamento da ração, cujos cuidados são idênticos às rações de outros animais (Autor).

Os danos ocasionados por fungos são muitas vezes desconsiderados até alcançarem proporções alarmantes. Esses microrganismos não causam apenas perdas diretas como também pode ameaçar a saúde do homem e de animais, através das micotoxinas. A ingestão de micotoxinas pode levar homens e animais a quadros de intoxicação aguda ou crônica (Gonzalez et al., 2001).

As micotoxinas são metabólitos secundários, sintetizados no final da fase exponencial de crescimento de alguns fungos. Muitas das micotoxinas são termoestáveis, ou seja, não são inativadas pelo tratamento térmico e muitas vezes não têm seu efeito diminuído por processos de beneficiamento como peletização em rações e acondicionamento em latas (Jay, 1996). Ainda segundo o autor alguns programas de descontaminação com produtos químicos são capazes de controlar o desenvolvimento de fungos e reduzir a concentração da micotoxina, mas deve-se levar em consideração a

relação custo/benefício da atividade. Estes procedimentos de descontaminação não são eficientes em larga escala, tendo um custo muito elevado e com resultados ainda bastante discutíveis.

Principais Gêneros Contaminantes

As fontes de contaminação por fungos são diversas: na fase de produção, na colheita, no manuseio no processamento. Esses microrganismos são frequentemente divididos em dois grupos: fungos do campo, que infectam o produto ainda no campo e fungos de armazenamento, que invadem o milho pouco antes e durante o armazenamento (Marcia e Lazzari, 1998). Segundo os autores a distinção entre fungos de campo e de armazenamento não é baseada na classificação taxonômica, mas de acordo com as condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento dos mesmos. Também não é absoluta, pois é baseada nos seus hábitos de crescimento e onde os danos ocorrem. Os fungos do campo requerem um teor de umidade em equilíbrio com uma umidade relativa de 90-100% para crescerem.

Os principais gêneros são *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Helminthosporium*, *Nigrospora*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma* que invadem grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano causado antes da colheita.

Os fungos de campo contaminam os grãos durante o cultivo por estes requererem ambientes com umidade relativa superior a 80%. Enquanto fungos de armazenamento demandam menor quantidade de água, desta forma, estes proliferam em maior intensidade na massa de grãos no período pós-colheita. As condições principais que influenciam no desenvolvimento de fungos em produtos armazenados são: teor de umidade dos grãos, temperatura, tempo de armazenagem, graus de infestação por fungo no campo, presença de material estranho e atividade de inseto e roedores. (autor)

Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas. Causam danos ao produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do mesmo. Os fungos dos gêneros *Aspergillus* (*A. halophilicus*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. alutaceos*, *A. ochraceus* e *A. flavus*) e os do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. verrucosum*) são os indicadores de deterioração em sementes e grãos causando germe, descoloração, alterações nutricionais,

perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (Sinha & Sinha 1992; Miller, 1995; Márcia & Lázari, 1998; Pinto, 1998).

O desenvolvimento de fungos pode ocorrer se: o grão foi armazenado antes de ter sido seco suficientemente, se o grão foi danificado durante a colheita ou na manipulação. Esses grãos ao serem processados e depois utilizados na alimentação animal podem causar doenças diversas devido às micotoxinas, que podem acarretar intoxicação (autor).

Animais jovens apresentam redução no consumo de ração contaminada, redução de crescimento e conseqüentemente perda de peso. A intoxicação pode proceder de forma direta ou indireta. A forma direta ocorre quando o produto é diretamente utilizado na alimentação dos animais. Enquanto a forma indireta resulta quando subprodutos e derivados contaminados são utilizados. Ao passo que na armazenagem podem ocorrer os seguintes danos: perda do valor nutritivo, descoloração do grão, redução de germinação, calcinação de grãos, geração de focos de aquecimento até o ponto de combustão espontânea e de migração de umidade na massa de grãos, aceleração das trocas químicas, redução da quantidade de matéria seca, cheiro e sabor mofento, formação de micotoxinas, criação de um ambiente adequado para o desenvolvimento de espécies de insetos especiais que são indicadores de grãos de baixa qualidade (Anônimo, 1992; Tanaka et al., 2001).

Estudos realizados por Farias et. al. (2000) revelou uma porcentagem de grãos com colonização fúngica, variando entre 0 a 100% prevalecendo *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, os três gêneros mais importantes envolvidos na produção de micotoxinas. Asevedo et al. (1994), que pesquisaram a microbiota fúngica e espécies produtoras de aflotoxinas em 90 amostras de milho estocados em diferentes regiões do Brasil, também isolaram os seguintes gêneros de fungos filamentosos apresentados em ordem decrescente: *Aspergillus* (72,2%), *Penicillium* (67,7%), *Fusarium* (62,2%). Adebajo et al. (1994) investigando a microbiota fúngica de milho e produtos à base de milho, também verificaram que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* eram predominantes.

Castro et al. (1995), estudando a microbiota em milho coletado em diferentes localidades do Estado de São Paulo, verificaram que os gêneros predominantes eram *Fusarium* e *Penicillium*, e o gênero *Aspergillus* foi o de menor frequência. Através da identificação como espécie, em 169 isolados do gênero *Aspergillus*, o fungo *A. flavus* foi predominante (64%), seguido por *E. amstelodami* (19%), *E. chevalieiri* (10%) e *A. parasiticus* (7%). Asevedo et al. (1994) também verificaram a predominância de *A. flavus*

(36,6%) seguido das espécies *A. oryzae* (9,9%), *A. parasiticus* (6,6%) e *A. ochraceus* (6,6%).

O desenvolvimento de micotoxinas pode ocorrer em diferentes períodos, durante a maturação do grão na colheita e no armazenamento. Raramente ocorre a produção de micotoxinas nos vegetais em nível de campo, pois os fungos que produzem toxinas não conseguem penetrar nos tecidos vivos, muitas vezes o fungo só consegue atacar após a colheita, quando há quebra da cutícula; proteção natural das sementes. (autor)

Apesar do crescimento do fungo em um determinado produto não indicar necessariamente a produção de toxinas pelo fato do fungo não ser obrigatoriamente toxigênico, é aconselhável analisar qualquer matéria-prima nestas condições. Por outro lado, muitos produtos que não apresentam crescimento visível do fungo podem conter quantidades suficientes de micotoxinas para causar uma intoxicação. Geralmente a produção ocorre principalmente na faixa de temperaturas de 18 a 26°C, teores de umidade superiores a 15% e a umidade relativa do ar entre 90 a 95%. (autor)

O alto teor de umidade é o fator isolado mais importante no desenvolvimento do fungo. Umidade relativa muito elevada, substrato propício (rico em carboidratos), temperatura adequada, pH superior a 5 e ambiente pouco arejado favorecem o seu desenvolvimento. A produção de micotoxinas só acontece em condições ótimas para a produção de toxinas são específicas para cada fungo. O fungo *Fusarium sporotrichioides* elabora uma toxina a temperaturas geladas, enquanto o *Aspergillus flavus* tem a habilidade de produzir toxinas a uma temperatura de 25° e até mesmo sob condições desfavoráveis (autor).

Temperaturas elevadas também favorecem o crescimento de fungos que se desenvolvem melhor em temperaturas entre 10°C e 35°C e em umidades relativas elevadas. O desenvolvimento prolongado de fungos em grãos de milho, por exemplo, com elevado teor de umidade, com temperaturas na faixa de 2°C a 7°C, pode resultar na formação de potentes micotoxinas. (autor)

O teor de umidade contida nos grãos tem um efeito concreto na germinação, colheita, armazenagem e processamento dos produtos. Para cada uma destas fases, há um teor de umidade ótimo ou crítico, acima ou abaixo dos quais os resultados podem ser não satisfatórios. (autor)

Análise microbiológica

O exame rotineiro de alimentos para detecção de uma numerosa série de microrganismos patogênicos é impraticável na maioria dos laboratórios devido ao fato de estes estarem inadequadamente equipados. Tem-se, portanto, tornado normal a prática de analisar nos alimentos a existência de bactérias, cuja presença indica a possibilidade da presença de bactérias produtoras de toxinfecções alimentares. Estas bactérias são denominadas microrganismos indicadores e são geralmente considerados como sendo de grande significância quando da avaliação da segurança e qualidade microbiológicas de alimentos (Hayes, 1995).

Segundo Hajdenwurcel (1998) os métodos rápidos surgiram a partir da década de 70 em consequência da necessidade de se reduzir o tempo de análise nos laboratórios de microbiologia, aumentando-se a produtividade do trabalho realizado. Tais métodos apresentam uma série de vantagens como redução do tempo de análise, significando menor retenção do produto na indústria, diminuição dos custos, simplificação nas tarefas

A análise microbiológica para se verificar quais e quantos microrganismos estão presentes é fundamental para se conhecer as condições de higiene em que o alimento foi preparado, os riscos que o alimento pode oferecer à saúde do consumidor e se o alimento terá ou não a vida útil pretendida. Essa análise é indispensável também para verificar se os padrões e especificações microbiológicos para alimentos, nacionais ou internacionais, estão sendo atendidos adequadamente (Franco & Landgraf, 1996).

Muitos métodos e variações de diferentes métodos que podem ser utilizados para detecção quantitativa e qualitativa de microrganismos em alimentos, estão relatados na literatura. Entretanto, é desejável utilizar métodos que tenham sido aprovados por órgãos reguladores. Estes podem ser métodos padrões ou recomendados. Atualmente esses métodos são comumente divididos em métodos convencionais e métodos rápidos (Franco & Landgraf, 1996; Ray, 1996).

O procedimento a ser empregado é determinado pelo tipo de alimento que está sendo analisado e pelo propósito específico da análise. A escolha pode também depender dos tipos de microrganismos a serem pesquisados em um alimento suspeito de ter causado uma doença (Pelczar Jr. et ai., 1997).

Segundo Feng (1995), os métodos rápidos aprovados pelos órgãos oficiais, podem ser utilizados somente para controle, sendo que resultados negativos são considerados como definitivos, mas resultados positivos são considerados presuntivos e devem ser confirmados por métodos padrões.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de Investigação

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Alagoas.

A ração e seus constituintes foram fornecidos pelo laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos. A constituição da ração utilizada no trabalho encontra-se no Tabela 1. Foram estudados os constituintes de origem vegetal (farinha da vagem de algaroba, farelo de soja e farelo de milho) e o suplemento mineral e vitamínico (premix).

Tabela 1. Constituintes da Ração para Tambaqui.

INGREDIENTES	% de ALGAROBA			
	0	25	50	100
CELULOSE	7,30	5,60	3,95	0,00
FARELO DE MILHO	27,20	22,80	15,50	0,00
FARINHA ALGAROBA	0,00	7,30	15,50	33,80
FARELO DE SOJA	43,96	42,35	42,25	41,94
L-LISINA	0,44	0,74	0,74	0,64
FARINHA DE PEIXE	5,00	5,00	5,00	5,00
HIDROXI BETIL TOLUENO (BHT)	0,02	0,02	0,02	0,02
DL-METIONINA	0,28	0,00	0,28	0,28
OLÉO DE SOJA	7,60	7,70	8,55	10,30
FOSFATO BICALCICO	3,75	3,86	3,86	3,97
CALCÁRIO	2,45	2,35	2,35	2,05
SAL	0,50	0,50	0,50	0,50
PREMIX	1,00	1,00	1,00	1,00
CARBOXI METIL CELULOSE (CMC)	0,50	0,50	0,50	0,50

3.2 Metodologia e Técnica de Análise

Amostras de 100 gramas de cada ingrediente: farelo de milho, farelo de soja, farinha da vagem de algaroba e premix, foram retiradas assepticamente e acondicionadas em frascos de vidro previamente esterilizados.

A ração foi acondicionada em sacos para congelamento de alimentos, hermeticamente fechados com capacidade para 500g e posta em prateleiras de madeira simulando as condições físicas do ambiente de um depósito ou armazém de rações desse tipo, onde fatores naturais como temperatura, ventilação, umidade e luminosidade estivessem o máximo semelhante ao local de estocagem de rações (Figura 1).



Figura 1. Acondicionamento e armazenamento da ração.

O procedimento para a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de amostra seguiu o esquema representado na Figura 2. De cada

amostra, uma sub-amostra de 25 gramas foi suspensa em 225 ml de solução salina esterilizada. Após agitação foram feitas diluições em série até 10^4 . Das diluições 10^2 - 10^4 alíquotas de 1,0 ml foram depositadas em placas de Petri (três placas para cada diluição). Adicionou-se a cada placa 15 ml do meio de cultura fundente e (44 ± 1) homogeneizado com movimentos suaves em torno de oito ou 10 vezes. As Unidades Formadoras de Colônias foram calculadas através da seguinte fórmula:

$$\text{UFC g}^{-1} = \frac{X \cdot FD}{V}$$

X = Média de cada diluição

FD = Fator de Diluição

V = Volume da diluição adicionado à placa de Petri.

Os fungos foram repicados sucessivamente para purificação e conservados sob refrigeração. As amostras dos constituintes foram retiradas antes da homogeneização dos mesmos, enquanto que para a ração as coletas ocorrerão ao 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

3.3. Purificação dos Fungos

Os fungos foram purificados por meio de repicagens sucessivas e semeadura em meio de BDA.

3.3.1 Microcultivo em Lâmina

Sobre a superfície de lâminas, apoiada sobre bastão de vidro, no interior de Placa de Petri (previamente esterilizada) verteu-se com auxílio de pipeta uma pequena alíquota de meio de suco de tomate liquefeito. Após solidificação do meio de cultura, esporos foram semeados no centro da superfície do meio. Uma porção de algodão foi umedecida em água destilada esterilizada, para manter a umidade durante a incubação e garantir o crescimento dos fungos. As placas com as culturas foram incubadas à temperatura ambiente. Os exames do desenvolvimento dos fungos foram efetuados através de observações ao microscópio diariamente.

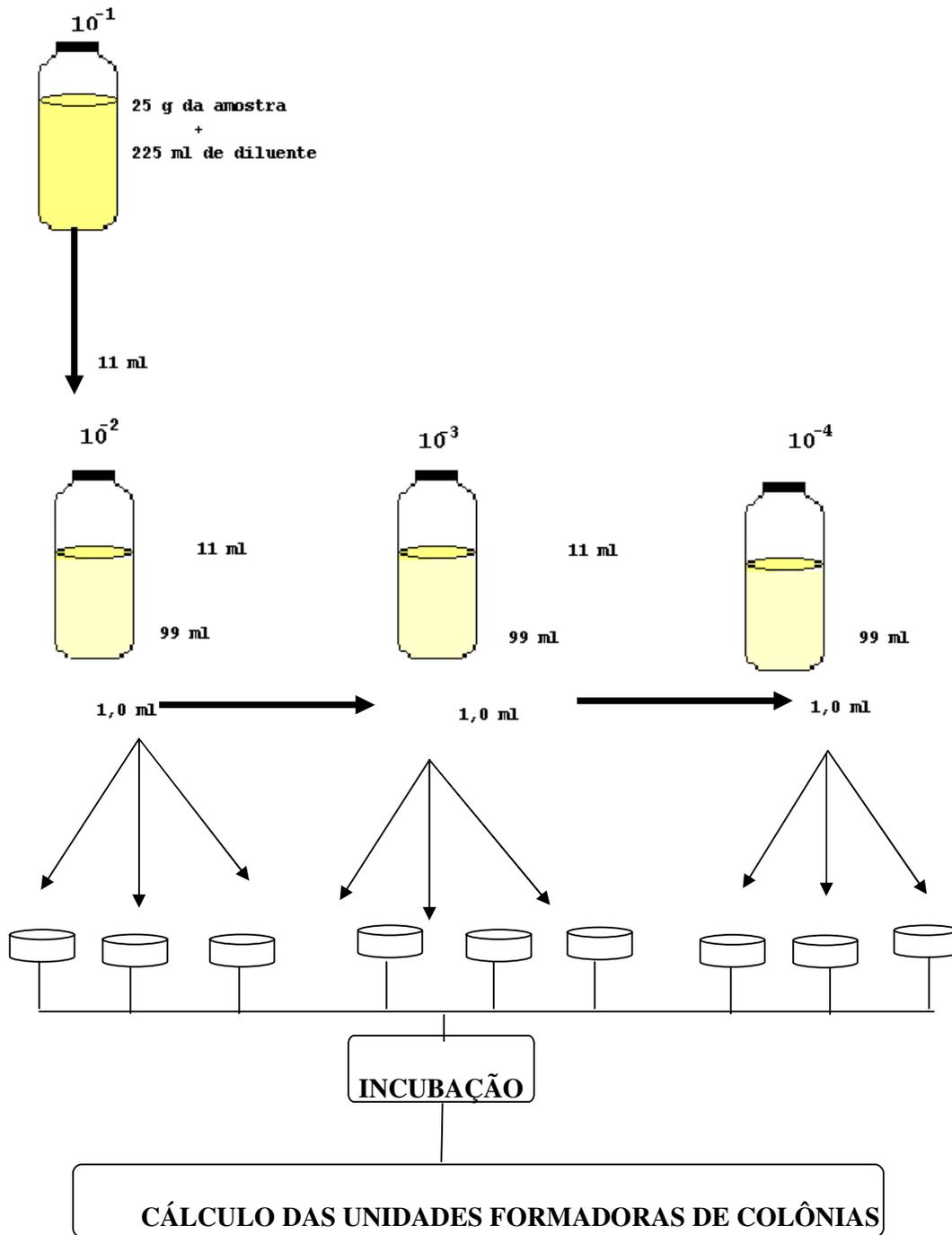


Figura 2. Esquema da técnica de contagem de microrganismos.

3.6. Meios de Cultura

Foram utilizados dois meios de cultura: meio de batata dextrose ágar (BDA) e ágar suco de tomate:

3.6.1 Meio De BDA Acidificado

Infusão de batata	200 ml
Dextrose	20,0 g
Ágar	15,0 g

Completar o volume para 1000 ml com água destilada.

3.6.2 Meio de Suco de Tomate

Suco de tomate	200 ml
Água destilada	800 ml
Ágar	15,0 g

3.6.3 Solução Salina

NaCl	8,50 g
Água destilada	1000 ml

3.7. Delineamento Experimental

Para a detecção de fungos nos constituintes de ração foi usado o delineamento em blocos ao acaso, com três repetições dispostas em arranjo fatorial; os dados foram transformados para $\text{Log}(x + 1)$ e submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey. Para a ração utilizou-se o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições, dispostos em arranjo fatorial, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste de Dunnet.

3.8. Padrão Microbiológico

Foi observado o regulamento técnico dos princípios gerais para estabelecimento de critérios microbiológicos para alimentos correlatos no anexo II da Agência de Vigilância Sanitária de outubro de 1999 item 9 (anexo), uma vez que o Brasil não dispõe de legislação própria até o momento para tal tipo de alimento animal, os resultados obtidos foram comparados às normas microbiológicas para rações fareladas padronizadas para a Holanda citadas por Andrigueto et al. (1990) e utilizadas por Santos et al (2000) e Gonçalves et al (2005) conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Normas microbiológicas para rações fareladas

Indicativo	Bom	Aceitável	Inaceitável
Contagem mesófilos	$< 10^6$	$10^7 >$	10^8
Enterobactérias/g	$< 10^4$	10^4 a 10^5	$> 10^6$
Fungos/g	$< 10^4$	10^4 a 10^5	$> 10^6$
<i>E. coli</i> em 0,1 g	Ausente	Presente	Presente
<i>Salmonella</i> em 25g	Ausente	Ausente	Presente

Dados adaptados de Andriquetto et al., 1990.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamentos de fungos nos constituintes da ração

A análise de variância dos resultados obtidos encontra-se na Tabela 3. O teste F detectou diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 3. Quadrados médios e coeficiente de variação obtidos da análise de variância do número de Unidades Formadora Colônias de fungo nos constituintes da ração. Dados transformados em $\log x + 1$. -RioLargo-AL, 2004.

Fonte de Variação	GL	QM
Constituintes	3	0,748 *
Repetições	11	3,390**
Resíduo	33	0,159
CV%		9,72

*,** Significativo a 5 e 1 % de probabilidade respectivamente pelo teste F.

Conforme se observa na Figura 2 o maior número de UFC foi detectado no Premix que, no entanto, não diferiu significativamente da farinha de algaroba, enquanto que, o farelo de soja e o farelo de milho apresentaram menores números de UFC não diferindo estatisticamente entre si.

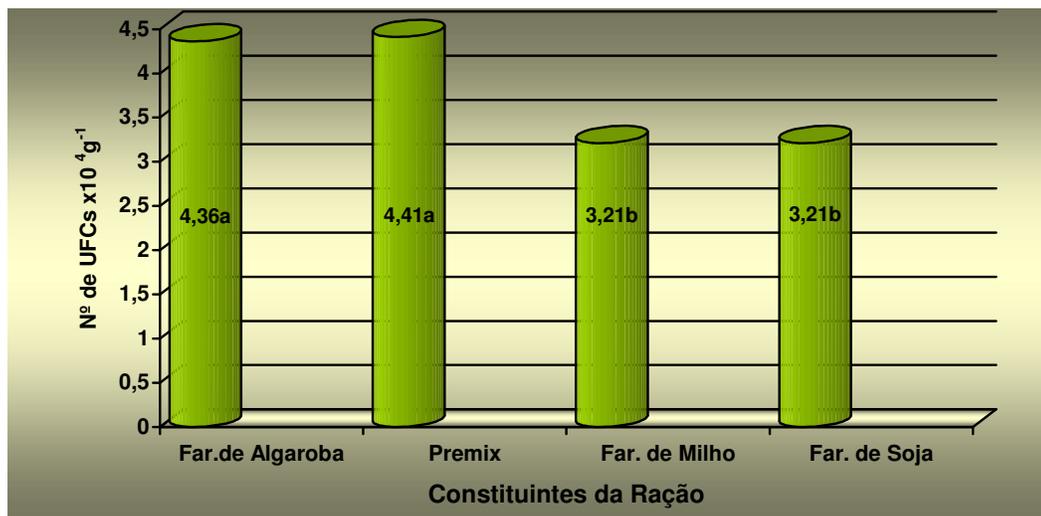


Figura 3. Médias do número de UFC de fungos nos constituintes da ração. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2 Isolamentos de fungos na ração

A análise de variância do número de UFC na ração encontra-se na Tabela 4, o teste F detectou diferenças significativas entre as percentagens de farinha de algaroba adicionadas à ração fator tempo e para a interação indicando efeito de um fator sobre o outro.

Tabela 4. Quadrados médios e coeficiente de variação obtidos da análise de variância do isolamento de unidades formadoras de colônias de fungos na ração. Dados transformados em $\log x + 1$.-RioLargo-AL, 2004.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QM
Tempo (A)	3	24,5936**
% de Algaroba (B)	3	7,7199**
AxB	9	3,2152*
Resíduo	48	1,3700
CV%		12,44

** * Significativo a 1 e 5 % de probabilidade respectivamente pelo teste F.

A Figura 3 apresenta os resultados do número de UFC detectado na ração.

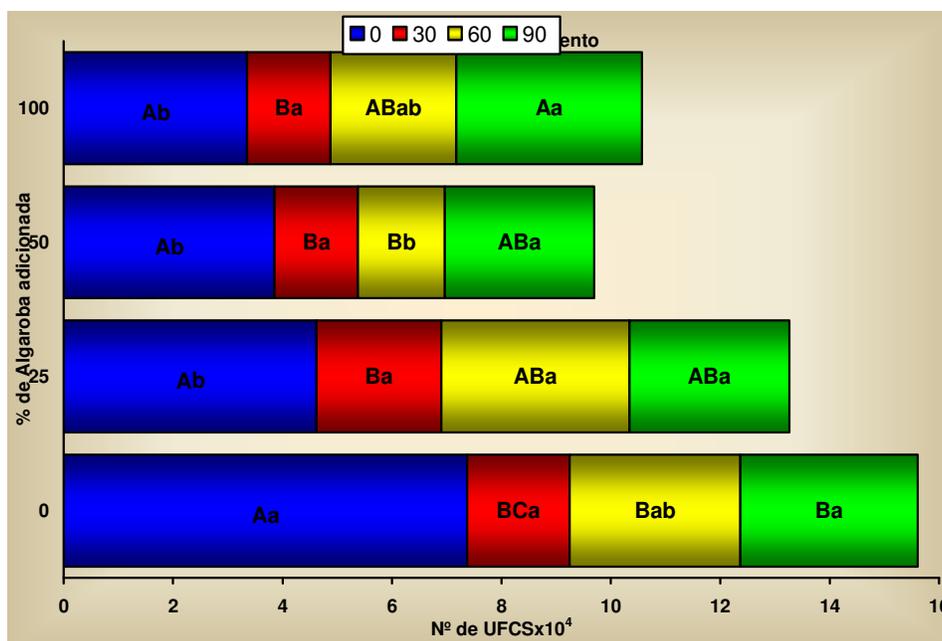


Figura 4. Médias do número de UFC de fungos nos constituintes da ração em diferentes tempos de armazenamento. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Com relação ao tempo de armazenamento o maior número de UFC ocorreu no tempo 0 e o menor aos 30 dias. Para % de algaroba adicionada o maior número de UFC foi observado no tratamento 0% e o menor com 50%.

Considerando-se a interação entre os dois fatores verifica-se que o maior número de UFC ocorreu no tempo 0 para tratamento sem farinha de algaroba ($7,37 \times 10^4$) enquanto que o menor foi detectado ao 30 dias de armazenamento para 50 e 100% de algaroba adicionada ($1,52 \times 10^4$).

Os gêneros encontrados nos constituintes e na ração encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Gêneros de fungos e sua origem encontrada na ração e seus constituintes. Rio Largo –Alagoas, 2004

Ingredientes	Gênero	Origem	Figura N°
Premix	<i>Aspergillus</i> sp	Armazenamento	04
Farinha de Algaroba	<i>Trichoderma</i> sp	Campo	05 A
	<i>Penicillium</i> sp	Armazenamento	B
Farinha de Milho	<i>Trichoderma</i> sp	Campo	06 A
	<i>Cladosporium</i> sp	Campo	B
Farinha de Soja	<i>Aspergillus</i> sp	Armazenamento	07 A
	<i>Curvularia</i> sp	Campo	B

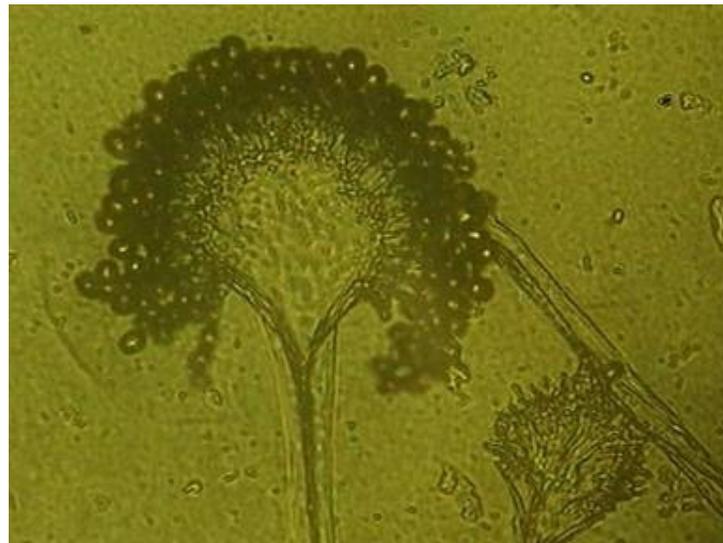


Figura 4. Microestrutura de *Aspergillus* sp isolado de premix.



Figura 5. Microestrutura de (A) *Trichoderma* sp e (B) *Penicillium* sp isolado da farinha de Algaroba.

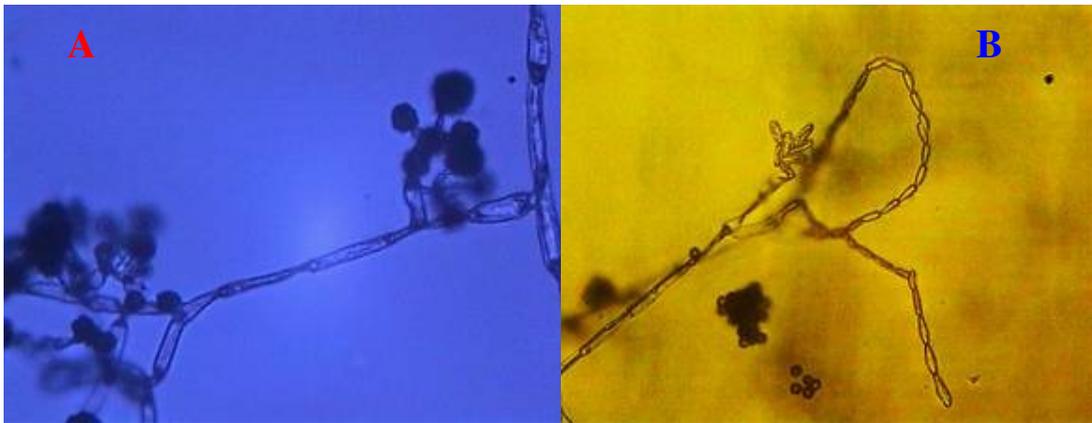


Figura 6. Microestrutura de (A) *Trichoderma* sp e (B) *Cladosporium* sp isolado da farinha de Milho.

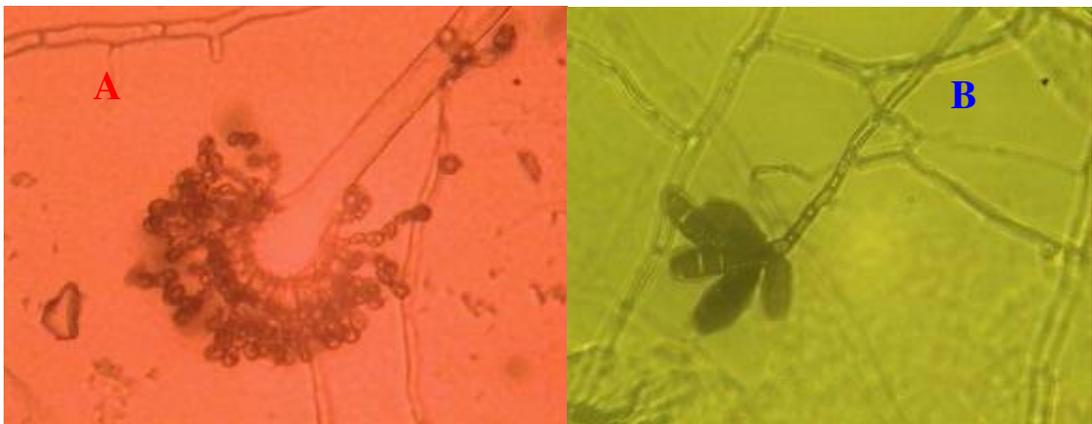


Figura 7. Microestrutura de (A) *Curvularia* sp e (B) *Aspergillus* sp isolado da farinha de Milho.

O milho é um cereal de altas qualidades nutritivas assim como uma importante fonte de energia além das fibras, o farelo de milho tem grande quantidade de

açúcares e calorias, servindo como alimento altamente propício à proliferação fúngica. Estudos com o farelo de soja e farinha de soja têm detectado principalmente a presença de aflotoxinas produzidas por *Aspergillus*, além destas, foram verificadas a presença de fumonisinas e zearalenona (autores).

Na farinha de algaroba detectaram-se as presenças de *Trichoderma* e *Penicillium* (Tabela 5) respectivamente fungos de campo e armazenamento. A parede da vagem de algaroba é altamente energética contendo sacarose e outras substâncias que se transformadas em farinha compõem um ambiente para o desenvolvimento fúngico podendo conseqüentemente ocorrer contaminação. Cabral Júnior (2003) detectou 10 gêneros de fungos nas sementes e vagens de algarobeira, sendo a maior incidência de *Penicillium*, *Trichoderma* e *Talaromyces*.

A presença de fungos de campo nestes macroingredientes pode indicar que não houve um adequado manuseio agrícola no cultivo das sementes ou um manuseio ineficiente de equipamentos comprometendo as condições higiênicas sanitárias.

No ingrediente premix foram encontrados os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium* (Tabela 5). O premix é uma pré-mistura de microminerais e vitaminas, tornando-se de fato um substrato muito rico em nutrientes, e os fungos por serem quimiotróficos absorvem esses nutrientes ao invés de ingeri-los, por isso a imensa importância do cuidado na fabricação e no armazenamento desse ingrediente fundamental na produção de uma ração(autor).

Os fungos de campo como *Trichoderma*, *Curvularia* e *Cladosporium* contaminam os grãos durante o cultivo e requerem Os fungos de campo contaminam os grãos durante o cultivo por estes requererem ambientes com umidade relativa superior a 80%. Enquanto fungos de armazenamento demandam menor quantidade de água, desta forma, estes proliferam em maior intensidade na massa de grãos no período pós-colheita. As condições principais que influenciam no desenvolvimento de fungos em produtos armazenados são: teor de umidade dos grãos, temperatura, tempo de armazenagem, grau de infestação por fungo no campo, presença de material estranho e atividade de inseto e roedores. (autor)

Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas. Causam danos ao produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do mesmo.

Considerando-se os resultados obtidos na análise da ração armazenada, não foram detectados gêneros fúngicos diversos daqueles encontrados nos ingredientes. Foi verificado um contraste em relação ao constituinte farinha de algaroba quando analisada separadamente o maior número de UFC ração com 0% de algaroba, indicando que a contaminação não é consequência deste ingrediente.

Com relação ao tempo, não ocorreu aumento da população ao longo do período de armazenamento (Figura 4). Indicando que no presente trabalho as condições de armazenamento não contribuíram para o aumento do número de UFC.

Embora os resultados deste estudo estejam abaixo da faixa máxima estipulada no trabalho de Andriquetto et al. (1990) para fungos, a presença destes é indesejável, pois quando presentes alguns deles podem produzir micotoxinas (ICMSF, 1981).

6 CONCLUSÃO

Dos dados obtidos no presente trabalho, foi constatada presença de fungos em todos os constituintes avaliados sendo o maior número de UFC detectado no Premix e que não diferiu estatisticamente da farinha de algaroba.

Com relação à % de algaroba adicionada à ração, o maior número de UFC foi encontrado foi observado no tratamento 0% e o menor com 50%.

O maior número de UFC ocorreu no tempo 0 e o menor aos 30 dias. Considerando-se a interação entre os dois fatores verifica-se que o maior número de UFC ocorreu no tempo 0 para tratamento sem farinha de algaroba enquanto que o menor foi detectado ao 30 dias de armazenamento para 50 e 100% de algaroba em substituição ao milho .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAJO, L.O.; IDOWU, A.A.; ADESANYA, O.O. **Mycoflora, and mycotoxins production in Nigerian corn and corn-based snacks.** *Mycopathologia*, Dordrecht, v.126, p.183-192, 1994.

ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY,L.; MINARDI,I.; GEMAEL, A.; et al. **As bases e os fundamentos da nutrição animal.** 4 ed.São Paulo:Nobel, 1990. 396 p.

ASEVEDO, I.G.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.;PAULA, C.R.; ALMEIDA, R.M.A.; SOUZA, V.M. **Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. isolated from stored maize.** *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.25, n.1, p.46-50, 1994.

CABRAL JÚNIOr, C. R.. Influência do tempo de desidratação e armazenamento sobre a ocorrência de fungos e destes na composição químico-bromatológica de algarobeira (*Prosopis juliflora*). 2003. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal)) - Universidade Federal de Alagoas.

CASTRO, M.F.P.; SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P.Z. **Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study.** *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.26, n.4, p.289-295, 1995.

FARIAS, A. X; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S. **Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.3, p.617-621, 2000.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M. ; FELICIO J. D. **Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999.** *O Biológico*, São Paulo, v.63, n.1/2, p.15-19, 2001.

HUFF, W. E. Et al. J. A **Mycotoxin interactions in poultry and swine.** *Journal of Animal Science* 66, p. 2351-2355. 1998.

INTERNATIONAL COMISSION ON MICRO-BIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de alimentos: técnicas de análises microbiológicas.** Zaragoza: Acribia. 1984.

JAY, M.J. **Modern food microbiology: mycotoxins**. 5.ed. New York : Chapman and Hall, p.595-611. 1996.

MÁRCIA, B. A; LÁZZARI, F. A. **Monitoramento de fungos em milho em grãos, grits e fubá** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, n.4 , p.363-367, 1998.

MILLER, J.D. **Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research**. *J. Stored Prod. Res.*, n.31, p.1-16. 1995.

PINTO, N.F.J.A. **Patologia de sementes de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1998. 44p. (Circular Técnica, 29).

POZZI, C.R. Milho pós-colheita e armazenado: **Microbiota Fúngica e a Ocorrência de Micotoxinas**. Pirassununga: Universidade de São Paulo, 1993,165p. Dissertação de Mestrado.

RANJAN, K.S.; SINHA, A.K. **Occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar, India**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Essex, v.56, p.39-47, 1991.

SINHA, K.K & SINHA, A. K. **Impact of stored grain pests on seed deterioration and aflatoxin contamination in maize**. *J. Stored Prod. Res.*, n. 28, p.211-219. 1992.

SILVA N, V.C.A JUNQUEIRA & NFA SILVEIRA. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SIQUEIRA R. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA. 1995.

TANAKA, M. A S.; MAEDA, J. A ; PLAZAS, I. H. A Z. **Microflora Fúngica de Sementes de Milho em Ambientes de Armazenamento** *Sci. Agric.* .58: (3), 2001.