

Níveis séricos de ocratoxina A e lesões em suínos no Rio de Janeiro, Brasil*

Cesar Daniel Krüger¹⁺, Leila Gatti Sobreiro², Rogério Tortelly²
Andrezza Maria Fernandes³ e Carlos Alberto da Rocha Rosa¹

ABSTRACT. Krüger C.D., Sobreiro L.G., Tortelly R., Fernandes A.M. & Rosa C.A.R. [Serum levels of ochratoxin A and lesion in swine in Rio de Janeiro, Brazil.] Níveis séricos de ocratoxina A e lesões em suínos no Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(3):198-202, 2015. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-00, Brasil. E-mail: cesarkruger@hotmail.com

In this study it was evaluated the concentration of ochratoxin A (OTA) in blood serum of 87 finished pigs from two slaughterhouses with state inspection in the Rio de Janeiro State, Brazil. Analyses were performed by high performance liquid chromatography, with 4.59% of positive samples. Interstitial inflammatory cell infiltration was the most frequent kidney injury found (35.63%) and inflammatory infiltrate in the portal space the most frequent alteration (12.64%) in liver. There was no significant correlation between histopathologic findings and ochratoxin A concentration in animals' serum. However, it cannot be affirmed that animals did not have contact with the toxin or that the kidney lesions observed cannot be generated by OTA action. Other studies related to OTA are necessary to clarify the nephropathy in swine.

KEY WORDS. Mycotoxins, OTA, chromatography, histopathology.

RESUMO. Neste estudo foi determinada a concentração de ocratoxina A (OTA) no soro sanguíneo de 87 suínos destinados ao abate em dois matadouros com Inspeção Estadual localizados na região serrana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. As análises foram efetuadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com 4,59% de amostras positivas. O infiltrado inflamatório intersticial foi a alteração mais frequente em rins (35,63%) e o infiltrado inflamatório em espaço porta (12,64%) o mais frequente no fígado. Não houve correlação entre os achados histopatológicos e a ocorrência da micotoxina no soro dos animais. No entanto, não se pode afirmar que os animais não tiveram contato com a toxina

ou que as lesões renais observadas não possam ter sido provocadas pela ação da OTA. Outros estudos relacionados à OTA em suínos se fazem necessários para esclarecer casos de nefropatias em suínos. PALAVRAS-CHAVE. Micotoxinas, OTA, cromatografia, histopatologia.

INTRODUÇÃO

A ocratoxina é uma micotoxina com propriedades nefrotóxicas, teratogênicas e imunossupressoras, podendo ser detectada em diferentes grupos de alimentos e bebidas (Regulamento CE 123, 2005). A ocratoxina A (OTA) é produzida por algumas espécies fúngicas do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*,

* Recebido em 14 de abril de 2013.

Aceito para publicação em 25 de abril de 2014.

¹ Médico-veterinário, PhD, Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: shalako@ufrj.br; ⁺Autor para correspondência, E-mail: cesarkruger@hotmail.com

² Médico-veterinários, PhD, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil, 64, Niterói, RJ 24320-340, Brasil. E-mails: lgatti@vm.uff.br; rtortel@microlink.com.br

³ Médica-veterinária, PhD, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, Pirassununga, SP 13635-900, Brasil. E-mail: andrezza@usp.br

sendo a mais abundante e tóxica entre as ocratoxinas (Pittet 1998). A Agência Internacional para Estudo do Câncer classifica a OTA como possível carcinógeno humano do grupo 2B (IARC 1993).

A distribuição da OTA pelos tecidos dos animais varia com a via de introdução, com o tempo decorrente da entrada da OTA no organismo e com a perfusão sanguínea do órgão atingido. Sabe-se que através da via oral, a maior concentração de OTA foi encontrada após 24h, principalmente no trato gastrointestinal, seguido de significativos níveis nos rins, fígado, cérebro, músculos, pele e gordura (Galtier 1991).

Assim como o homem, o suíno, ao ingerir o alimento contaminado com a micotoxina, pode iniciar um processo de intoxicação que varia da forma aguda à crônica, dependendo da concentração e duração da exposição à toxina e da idade e estado nutricional do animal (Dragacci et al. 1999). Os sinais clínicos provocados pela OTA em suínos podem ser confundidos com deficiências de manejo, com outras doenças ou com deficiências nutricionais (Dilkin 2002).

A realização do exame anatomopatológico é um dos passos para a detecção da contaminação por micotoxinas pela visualização de lesões sugestivas da doença (Barisic 2002). A análise sanguínea da presença de resíduos de OTA pode ser correlacionada aos achados histopatológicos (Golinski et al. 1984). Em alguns estudos comparativos entre os níveis de OTA em diferentes tecidos, observaram-se concentrações da toxina no sangue e no plasma, respectivamente, cinco a 13 vezes maiores do que as concentrações nos rins (Hult 1979).

A OTA pode entrar na cadeia alimentar humana por meio de cereais, sementes oleaginosas, frutas, produtos de panificação, cervejas, vinhos e através de produtos de origem animal oriundos de suínos alimentados com rações contaminadas pela toxina (Dragacci et al. 1999). No Brasil são escassos os dados epidemiológicos sobre a ocorrência de ocratoxina A em alimentos, apesar de o país é um dos maiores produtores e exportadores de grãos e carnes. A legislação referente a limites de tolerância para OTA é variável. A Dinamarca estabelece o máximo de 25 µg/kg para rins suínos. Na Suécia, a ração completa para suínos não pode exceder 100 µg OTA/kg. A Itália permite até 1 µg OTA/kg de carne de porco e derivados. Limites para OTA foram estabelecidos somente recentemente no Brasil, contemplando cereais, café, vinhos, produtos de cacau e frutas secas, com níveis máximos variando de 2,0 a 10,0 µg/kg, dependendo do produto (Anvisa 2011).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de ocratoxina A no soro sanguíneo de suínos abatidos na região serrana do Rio de Janeiro, correlacionando a presença da toxina às lesões renais e hepáticas nestes animais.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no laboratório de Bromatologia do Departamento de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da UFF.

Foram analisadas 87 amostras de soro sanguíneo de suínos e seus respectivos rins e fígados, selecionados de forma aleatória e mantendo a correspondência as amostras. Destas, 67 amostras foram coletadas no matadouro sob o Serviço de Inspeção Estadual (SIE) 572 e 20 amostras foram coletadas no matadouro sob o SIE 582.

O sangue foi coletado no momento da sangria, após a insensibilização, diretamente no tubo de ensaio sem anticoagulante e colocado em seguida em estantes apropriadas onde permaneceram em repouso por 12 horas em temperatura ambiente para a obtenção do soro e posterior processamento. As amostras de rim e fígado foram coletadas em frascos plásticos e conservadas em formol na concentração de 10% após serem fatiadas de forma perpendicular em uma espessura de não mais que 1 cm. Estas amostras foram coletadas de maneira aleatória, isto é, sem distinção da presença ou não de lesões macroscópicas, seguindo apenas a correspondência com o sangue.

O procedimento analítico utilizado para a detecção de OTA baseou-se na extração da micotoxina de acordo com os procedimentos preconizados por Curtui & Gareis (2001). A amostra de 50 mL de sangue coletada por punção jugular foi submetida a repouso por 10 a 12 horas em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 3.000 g por 15 min. O soro foi estocado a -20°C. Uma alíquota de 0,8 mL de soro, juntamente com 0,2 mL de TCA 15% e 1 mL de diclorometano foram colocados em um microtubo de 2 mL. Esta mistura foi homogeneizada em vortex por 30 segundos, seguida de repouso em temperatura ambiente por 4 a 48 horas, e nova centrifugação a 16.060 g por 5 min. Nesta etapa, três camadas eram formadas. Retirou-se cuidadosamente a camada inferior (diclorometano), que foi colocada num tubo de 1,5 mL e reservada. Submeteu-se a camada formada entre as duas fases (compacta) com a camada superior (ácida) a uma nova extração, adicionando 0,5 mL de diclorometano, homogeneizando por 30 segundos e centrifugando a 16.060 g por 3 min. Novamente eram formadas três camadas. A camada inferior foi adicionada ao extrato de diclorometano e as outras duas foram desprezadas. Evaporou-se o diclorometano até a secagem em evaporador a temperatura de 40° C sob baixo fluxo de nitrogênio e seguiu-se para o sistema de cromatografia.

A separação e a quantificação da OTA foram conduzidas em um sistema de cromatografia líquida equipa-

do com uma bomba isocrática (Waters®, modelo 510), detector de fluorescência (Agilent®, modelo 1100 series, excitação: 330 nm, emissão: 460 nm) e um injetor de loop fixo (Rheodyne® Modelo 7125, Cotati, CA, USA). Foi utilizada coluna Microsorb Varion® MV G8, C18 (5 µm, 15 x 4,6 mm). Um volume de extrato reconstituído de 20 µL foi injetado no sistema de cromatografia. A fase móvel, preparada imediatamente antes do início das análises, foi constituída por acetonitrila, água ultrapurificada e ácido acético (57:41:2; v/v) (Curtui & Gareis 2001) e foi utilizado fluxo de 1 mL/min com duração da corrida de 20 min por amostra. Foram injetados no sistema de cromatografia volumes de 20 µL de amostras. O tempo de retenção observado foi de aproximadamente 5 minutos. Para a quantificação da toxina, foram considerados os tamanhos dos picos formados pelas amostras no tempo de retenção obtido, comparados com o valor médio dos padrões.

O padrão de ocratoxina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) foi analisado espectrofotometricamente (massa = 0,0737 µg/mL) e quantificado segundo metodologia preconizada pela AOAC (Scott 1995). A solução estoque permaneceu armazenada em metanol (MeOH), em frasco âmbar, a temperatura de -18°C. Esta solução foi utilizada no preparo dos padrões da curva de calibração, utilizando concentrações de 0,073 a 7,73 ng/mL. Os padrões foram injetados antes, durante e depois das análises para garantir a calibração das leituras.

Os fragmentos de rim e fígado coletados que estavam previamente fixados em formol a 10% foram remetidos ao laboratório de Anatomia Patológica Veterinária da UFF. Estes fragmentos foram processados pelas técnicas habituais para inclusão em parafina e corados por hematoxilina-eosina. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia empregada para a detecção de OTA em soro sanguíneo mostrou-se eficiente e apresentou valores de recuperação de 82% para níveis de 0,73 ng/mL, sendo que os limites de quantificação e detecção foram de 0,073 ng/mL e 0,062 ng/mL, respectivamente. A linearidade de detecção por fluorescência em 330 nm de excitação e 460 nm de emissão dos padrões de OTA injetados em concentrações de 0,073 a 7,73 ng/mL foram de 0,8924 (linear) e 0,9265 (logarítmica).

Em 87 amostras de soro sanguíneo analisadas, foi detectada ocratoxina A em quatro amostras (4,6%), as quais apresentaram concentrações variando de 0,1546 a 1,4851 ng/mL. Entre as amostras positivas, a média foi de 0,5739 ng/mL, com desvio padrão de 0,6130. As demais amostras apresentaram níveis inferiores ao limite de quantificação.

Em estudo avaliando somente a presença de OTA em soro de suínos de diferentes Estados do Brasil, foram encontrados 68% de amostras positivas no Rio de Janeiro, com níveis compreendidos

entre 0,16 a 115 mg/L. Nos Estados do Mato Grosso, Santa Catarina e Bahia foram observados 75%, 60% e 36% de amostras positivas, respectivamente, em níveis de 0,17 a 75,4 mg/L (Krüger et al. 2010). Na Alemanha, Mallmann et al. (1994) encontraram, em um total de 444 amostras de soro de suínos analisadas, 32,21% das amostras contaminadas com OTA em concentrações superiores a 0,6 ng/mL.

Não houve correlação entre a concentração de OTA no soro e os achados histológicos. Dos quatro animais com níveis detectáveis de ocratoxina A no soro sanguíneo, dois não apresentaram lesões renais ou hepáticas, um apresentou infiltrado inflamatório nos dois órgãos, e um apresentou no fígado um discreto infiltrado inflamatório em espaço porta. Além disso, dos 83 (95,41%) suínos que não apresentaram ocratoxina A em níveis detectáveis, 60 (72,29%) apresentaram alguma lesão, sendo 45 (54,22%) apenas nos rins, seis (7,23%) apenas no fígado, nove (10,84%) nos dois órgãos e 23 (27,71%) não apresentaram lesões.

De modo geral, os casos de nefropatia suína por micotoxinas podem ser identificados por degeneração e atrofia tubular, fibrose periglomerular e intersticial, descamação e necrose das células epiteliais dos túbulos contornados proximais (Krogh et al. 1979). Neste estudo, os achados mais frequentemente observados nos rins incluíram infiltrado inflamatório intersticial (39,08%), multifocal (16,09%) e degeneração tubular (11,48%). Outros achados menos frequentes nos rins foram: infiltrado inflamatório subcapsular, infiltrado inflamatório em região córtico-medular, infiltrado inflamatório nodular com característica vacuolar rico em figuras de mitose com imagem de céu estrelado, glomerulonefrite membranosa, fibrose nodular periglomerular, atrofia tubular, vasculite mononuclear, presença de cilindros na luz tubular e áreas de necrose, perda proteica em túbulos de região subcapsular e hipertrofia de células epiteliais.

Ainda que algumas lesões renais sejam patognômicas para a nefropatia suína por micotoxinas, existe grande dificuldade de se condenar um animal suspeito de nefropatia e definir que as lesões foram ocasionadas pela ingestão de ocratoxina, já que o mesmo pode ser acometido por inúmeras outras patologias que também podem produzir sintomas semelhantes aos da ocratoxicose (Sobestiansky et al. 1999). Entretanto, o contrário também pode ser afirmado, não se devendo descartar a possibilidade de a alteração renal encontrada ser causada por ocratoxina A ou ainda pela interação entre ela e outras micotoxinas.

No fígado o achado mais frequente foi o infiltrado inflamatório em espaço porta (12,64%). Os achados menos frequentes foram: processo congestivo hemorrágico centro-lobular associado a processo inflamatório mononuclear em espaço porta, hepatite focal nodular crônica granulomatosa, ocasional cariomegalia, discretos focos de telangiectasia, colangiohepatite fibrosa focal e discreta fibrose.

A maioria dos achados foi semelhante aos relatados em muitos outros trabalhos sobre ocratoxinas (Marquardt & Frohlich 1992, Harvey et al. 1994, Stoev et al. 2001). No entanto, as alterações anatomopatológicas variaram muito e não puderam ser determinadas como condição específica para a presença da ocratoxina A.

Deve-se ressaltar que a presença de lesões teciduais e a não detecção de ocratoxina A no sangue ou tecidos não significa que este animal esteja livre da micotoxina ou não tenha entrado em contato com a mesma. A não detecção de níveis de ocratoxina pode ocorrer por estes valores estarem abaixo do limite mínimo de detecção da análise cromatográfica ou pela realização da análise em uma fase em que a micotoxina já foi eliminada do organismo, restando apenas as lesões ocasionadas por sua ação altamente nefrotóxica e, em menor grau, hepatotóxica (Marquardt & Frohlich 1992, Jorgensen & Petersen 2002). Alguns estudos indicam que exista uma correlação entre a concentração de OTA encontrada no soro com a que existe nos rins. De acordo com estes estudos a concentração no soro é de 5 a 8 vezes maior que a dos rins (Madsen et al. 1982, Matrella et al. 2006).

Considerando-se que a maioria dos casos de nefropatia em matadouros com inspeção não tem suas causas definidas, outros estudos relacionando a transferência de ocratoxina A da alimentação para o soro sanguíneo de suínos em várias fases e a ocorrência de lesões renais e hepáticas se fazem necessários.

CONCLUSÃO

Neste estudo, foi encontrada ocratoxina A no soro sanguíneo de 4,59% dos suínos avaliados, confirmando a necessidade de acompanhamento dos animais enviados aos matadouros, das rações oferecidas aos animais e dos produtos suínos. Apesar de as lesões encontradas nos rins não terem apresentado correlação com a presença da ocratoxina A no soro dos animais, não se pode afirmar que estes animais não tenham tido contato com a toxina ou que as lesões renais não possam ter sido provocadas pela ação da micotoxina. Considerando-se que

a maioria dos casos de nefropatia em matadouros com inspeção não tem suas causas definidas, outros estudos relacionados à OTA em suínos se fazem necessários.

Agradecimentos. À Dra. Glória Maria Direito, pelo apoio na realização deste trabalho, ao CNPq e Programa de Pós-Graduação do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da UFF pelo financiamento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta pública 100, de 21 de dezembro de 2009. Capturado em: <http://www.abic.com.br/publique/media/CONS_leg_CONSPUB100.pdf.>
- Barisić K., Petrik J., Rumora L., Cepelak I. & Grubisić T.Z. Expression of Hsp70 in kidney cells exposed to ochratoxin A. *Arch. Toxicol.*, 76:218-226, 2002.
- Curtui V.G. & Gareis M. A simple HPLC method for the determination of the mycotoxins ochratoxin A and B in blood serum of swine. *Food Add. Contam.*, 18:635-643, 2001.
- Dilkin P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. *O Biológico*, 64:187-191, 2002.
- Dragacci S., Grosso F., Bire R., Fremy J.M. & Coulon S. A French monitoring programme for determining ochratoxin A occurrence in pig kidneys. *Nat. Tox.*, 7:167-173, 1999.
- Galtier P. Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. *IARC Sci. Publ.*, 115:187-200, 1991.
- Golinski P., Hult K., Grabarkiewicz-Szczesna J., Chelkowski J., Kneblewski P. & Szebiotko K. Mycotoxic porcine nephropathy and spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidneys and blood of Polish swine. *App. Environm. Microbiol.*, 47:1210-1212, 1984.
- Harvey R.B., Kubena L.F., Elissalde M.H., Rottinghaus G.E. & Corrier D.E. Administration of ochratoxin A and T-2 toxin to growing swine. *Am. J. Vet. Res.*, 55:1757-1761, 1994.
- Hult K., Hökby E., Hägglund U., Gatenbeck S., Rutqvist L. & Sellyey G. Ochratoxin A in pig blood: method of analysis and use as a tool for feed studies. *App. Environ. Microbiol.*, 38:772-776, 1979.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Ochratoxin A. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substance: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, 56:489-521, 1993.
- Jorgensen K. & Petersen A. Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs. *Food Add. Contam.*, 19:562-567, 2002.
- Krogh P., Elling F., Friis C.H.R., Hald B., Larsen A.E., Lillehoj E.B., Madsen A., Mortensen H.P., Rasmussen F. & Ravnskov U. Porcine nephropathy induced by long-term ingestion of ochratoxin A. *Vet. Pathol.*, 16:466-475, 1979.
- Krüger C.D., Cavaglieri L.R., Direito G.M., Keller K.M., Dalcero A.M. & Rosa C.A.R. Ochratoxin A in serum of swine from different Brazilian states. *J. Vet. Diag. Invest.*, 22:753-756, 2010.
- Madsen A., Mortensen H.P. & Hald B. Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. I. Influence on pig performance and residues. *Acta Agric. Scand.*, 32:225-239, 1982.
- Mallmann C.A., Santurio J.M., Baldissera M.A. & Mickwitz G.von. Determination of ochratoxin A in blood serum of pigs by using thin layer chromatography. *Rev. Microbiol.*, 25:107-111, 1994.
- Marquardt R.R. & Frohlich A.A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Animal Sci.*, 70:3968-3988, 1992.
- Matrella R., Monaci L., Mililo M.A., Palmisano F. & Tantillo M.G. Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swine slaughtered in southern Italy. *Food Control*, 17:114-117, 2006.
- Pittet A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds - an update review. *Revue Méd. Vet.*, 149:479-492, 1998.

Regulamento CE 123/2005. *Jornal Oficial da União Europeia*. 26 jan 2005.
Altera o Regulamento CE 466/2001 no que diz respeito à ocratoxina A. L 25, 3-5, 2005.
Scott P.M.. Mycotoxin methodology. *Food Add. Contam.*, 12:395-403, 1995.
Sobestiansky J., Barcellos D.E.S.N., Moraes N., Carvalho L.F.O.S., Oli-

veira S.J.O., Moreno A.M. & Roehe P.M. *Clínica e Patologia Suína*. Pfizer, Goiânia, 1999, p.464.
Stoev S.D., Vitanov S., Anguelov G., Petkova-Bocharova T. & Creppy E.E. Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid. *Vet. Res. Com.*, 25:205-223, 2001.