

## AFLATOXINA E CÂNCER HEPÁTICO<sup>1</sup>

JEFFERSON ANDRADE DOS SANTOS<sup>2</sup>

### Sumário

O autor revê as principais micotoxicoses dos animais e da espécie humana, e logo após focaliza o problema da aflatoxina, passando em revista o seu histórico, sua patogenia e sua profilaxia. Por fim, mostra as relações entre a aflatoxina e um câncer epizoótico que vem estudando em coelhos, além de tentar estabelecer correlações entre a aflatoxicose e certos tumores do fígado.

### INTRODUÇÃO

Tudo indica que a primeira referência à doença em mamífero produzida pela ingestão de toxina de cogumelo (micotoxicose) é dada por Schwarte *et al.* (1937) que registram sérias perdas em cavalos nos Estados Unidos, as quais já vinham ocorrendo há muitos anos e atribuídas à intoxicação por milho mofado.

Tal doença é conhecida nos Estados Unidos com os nomes de "moldy corn disease" isto é, doença do milho mofado, de "cornstalk" doença da haste do milho, leucoencefalite, isto é, encefalite comprometendo a substância branca e encefalite aguda hemorrágica.

Segundo os autores acima mencionados, uma acentuada exacerbação na doença foi notada em Iowa no inverno de 1934 e na primavera de 1935, quando apreciável número de cavalos morreu. Como tais animais exibissem sintomatologia nervosa lembrando a da encefalomielite equina, tentativas de isolamento do vírus desta doença foram feitas com resultados negativos. Culturas bacteriológicas efetuadas indicavam a presença de coli e diplococos, germes sem ação patogênica reconhecida para o sistema nervoso dos animais. Do mesmo modo a histopatologia do sistema nervoso dos animais afetados revelou alterações bastante diversas daquelas conhecidas na encefalomielite equina. Assim uma necrose coliquativa na substância branca do cérebro e cerebelo era apreciada nos animais mortos pela doença. Tais focos eram melhor observados na substância branca, entre os centros motores da corteza cerebral

e o corpo estriado. As alterações eram macroscópicas ou microscópicas; em aproximadamente 50% dos casos eram do primeiro tipo. As lesões necróticas eram freqüentemente de cor amarelada, contrastando nitidamente com a substância branca encefálica; os grandes focos necróticos eram hemorrágicos.

A anamnese indicava quase sempre o aparecimento da doença de janeiro a maio; os cavalos tinham ingerido quase sempre aveia, porém haviam sido arraçados também com quantidades consideráveis de milho mofado.

Em Iowa, a afecção ocorre normalmente de novembro a maio, quando a encefalomielite equina desaparece.

Em muitos casos, a morte dos animais se registrava após o seu regresso dos campos de milho.

A correlação entre a ingestão de milho mofado e o aparecimento da doença foi estabelecida pelos autores, que administrando o cereal contaminado pelo fungo, reproduziram doença idêntica a que ocorre em condições naturais. Conseguiram ainda êstes autores demonstrar que o material retirado das porções liquefeitas do encéfalo dos cavalos, quando injetado em cobaias, produzia a morte de alguns destes animais, aproximadamente 6 a 8 horas após a inoculação.

Chaves (1950) trabalhando em nosso País, registra em cavalos e muars de unidade do Exército sediada em Pirassununga, São Paulo, doença nervosa que foi debelada com a retirada da alimentação de amostras de milho mofado, as quais vinham sendo administradas àqueles animais.

Ainda na literatura norte americana, em 1953 aparece numa segunda referência do assunto, desta vez registrando-se a toxicose em bovinos.

Neste trabalho é mencionado que a toxina aparecia quando o milho era atingido pela geada ainda imaturo; a afecção não aparecia quando o cereal era colhido por meio de máquinas.

<sup>1</sup> Palestra proferida em 19 de agosto de 1964. Boletim Técnico n.º 1 da Divisão de Tecnologia Agrícola e Alimentar (DTAA).

<sup>2</sup> Veterinário da DTAA e Prof. Catedrático da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Niterói, RJ.

Mortandade atingindo até 100%; a doença aparecia aproximadamente 7-10 dias após o gado ter acesso ao milho; cessava mais ou menos um dia após a retirada.

Havia sintomas nervosos, coma e por fim a morte.

As lesões observadas eram sobretudo hemorragias petequiais e equimóticas nos diferentes órgãos, tumefação do fígado e edema âmbar da parede da vesícula biliar. Como as lesões hemorrágicas sugerissem as da septicemia hemorrágica, foram procedidas culturas de órgãos sem que se obtivesse o crescimento de *Pasteurella*. As melhoras temporárias obtidas com a administração de glicose aos animais, constituíram outro indicio da não infecciosidade do processo.

Iwanoff (1958) referiu-se à ocorrência da doença na China.

Assim, este autor registra a doença naquele país, onde era até então desconhecida; comprometia equídeos, lembrando uma encefalite aguda.

Era afebril e fatal dentro de seis horas a cinco dias. A moléstia podia ser diferenciada da encefalomielite equina pela falta de icterícia e pelo excesso de bilirrubina e de determinadas células no sangue circulante.

Havia principalmente edema e necrose do cérebro, esta acometendo sobretudo a substância branca. Idênticas alterações eram observadas em diferentes regiões da medula, principalmente em sua substância cinzenta. Havia ainda inflamação hemorrágica e erosões da mucosa do trato intestinal, bem como hemorragias na mucosa da bexiga.

A doença foi reproduzida em 9, de 14 jumentos alimentados com 1,5 a 3,5 libras de milho mofado, durante 11 a 53 dias consecutivos. Foi esta micotoxicose considerada idêntica à descrita nos Estados Unidos e o autor sugere a denominação "Encefalomalacia micotóxica", para a mesma.

Finalmente, Sippel *et al.* (1953) também nos Estados Unidos, registraram em bovinos e suínos, toxicoses por ingestão de vegetais mofados.

As principais alterações eram petéquias e equimoses em diferentes órgãos e mesmo hemorragias maciças ao lado, hepatite e nefrites tóxicas.

Os animais morriam após doença de 1 a 2 dias de evolução, caracterizada por prostração e icterícia além de outros sinais. Nos casos de evolução mais lenta, profundas alterações do parênquima hepático com necrose grave e extensas hemorragias, lembrando o quadro no todo o das hepatites por envenenamento por gossipol.

A condição mórbida foi reproduzida através a ingestão de milho mofado, mas não pela administração dos fungos isolados.

### STACHYBOTRYOTOXICOSIS

Nos anos de 1931-2, foi observado em várias propriedades da Rússia, uma enfermidade de cavalos, com mortalidade muito elevada. Pesquisadores incumbidos do estudo da doença verificaram que se tratava de uma moléstia ainda desconhecida. Como sua etiologia fôsse obscura foi a doença denominada "moléstia ignorada" e como tal afecção se disseminasse muito, foi chamada "enfermidade das massas".

Sòmente em 1938-9, foi identificado o seu agente etiológico, o fungo *Stachybotrys alterans*, saprófita do feno.

A doença aparece em determinadas regiões e em certas estações do ano. Os primeiros casos se registraram após as colheitas, quando os animais voltavam do pasto para as cavalariças, passando do regime de alimentos verdes para o de secos, nos galpões.

A mortandade é pequena nos meses de setembro e outubro, aumentando em seguida até o mês de abril e desaparece totalmente com o início da alimentação verde no pasto. Animais que sobrevivem à doença podem adoecer no ano seguinte.

Após cinco dias aproximados da irrupção da doença, 50 a 60% dos animais estão afetados. Entre o 5.º e o 7.º dias, quase todos os animais estão doentes.

Em condições naturais a infecção só foi observada em cavalos.

Falam os autores em duas formas da doença: típica e atípica.

A primeira é mais rara; começa com estomatite catarral em que há a formação de úlceras superficiais bem delimitadas, localizadas nas mucosas das bochechas. Úlceras idênticas surgem nos lábios e nas gengivas. Nos limites da pele com a mucosa, nos ângulos dos lábios, observam-se erosões de aspecto branco-sujo; os lábios mostram-se tumefeitos, a salivação é abundante e os gânglios sub-maxilares hipertrofiados. Rinite e conjuntivite. Temperatura pouco elevada e o estado geral quase inalterado. Este quadro clínico dura 8 a 12 dias e é considerado o primeiro estágio da doença.

Às vezes os sintomas são pouco visíveis e a pele se descama com facilidade.

No 2.º estágio são muito características as alterações sanguíneas, traduzidas por agranulocitose. Caem não só leucócitos, como também trombócitos. A queda se dá rapidamente — 500 a 2000 leucócitos por mm<sup>3</sup>; 2 a 3 trombócitos por lâmina.

Não obstante estas graves alterações sanguíneas, pulso, respiração e temperatura normais. Peristaltismo irregular. Este estado dura 15-20 dias.

Na terceira fase a temperatura se eleva, a agranulocitose se acentua mais (400 a 1.000 leucócitos por mm<sup>3</sup>). O número de trombócitos cai catastróficamente. O estado geral se mantém bom e só uma temperatura elevada indica uma doença grave. Perturbações digestivas sob a forma de cólicas. Formações necróticas persistentes na mucosa bucal. Fêmeas em gestação abortam. Nesse estágio, os animais morrem em 1 a 6 dias.

A forma atípica é mais freqüente. Na maior parte dos casos faltam as lesões bucais. Há uma discreta estomatite; sensibilidade geral e reflexos reduzidos ou quase ausentes. A sensibilidade pode aumentar acima do normal. Simultaneamente, redução da visão, a qual pode culminar com cegueira total.

Os movimentos do animal lembram os da hidrocefalia crônica; as pernas se cruzam, a cabeça é apoiada na parede ou nos comedouros. Em fase de excitação há movimentos violentos mas incertos; em muitos casos os movimentos são cautelosos. A temperatura sobe até 41°C, caindo após 2 a 3 dias a cifras quase normais.

Inapetência, peristaltismo enfraquecido, dificuldades na deglutição, sede. Batimentos cardíacos fracos e acelerados. Convulsões clônicas, tremores musculares. Ausência de modificações hematológicas. Morte em 1 a 2 dias.

A melhoria da visão permite um bom prognóstico. Neste caso o animal pode-se curar após 3 a 4 dias.

Na forma atípica se enquadram os casos em que a temperatura sobe acentuadamente em prazos curtos. Há sinais de choque, enfraquecimento das bulhas cardíacas, respiração convulsiva, cianose e hemorragias das mucosas das cavidades naturais. Quase todos esses casos terminam pela morte.

As diversas formas da moléstia, a sua duração, a seqüência dos vários estádios dependem da concentração do causador e de seu modo de agir, persistentemente ou não.

**Lesões.** As lesões são extraordinariamente características. Há numerosas hemorragias em forma de manchas, estrias e petéquias, na pleura costal, no baço, no intestino grosso. Lesões hemorrágicas são ainda localizadas nos pulmões, no fígado, nos rins, nas suprarenais, no cérebro, na medula e nas serosas. Não menos característicos são os focos necróticos em forma de manchas ovais de cor amarelo-cinza, localizados na mucosa dos lábios e das bo-

chechas, nas gengivas, no palatino duro e mole, nas tonsilas, com tendência a uma distribuição simétrica, especialmente nas tonsilas e no palatino. No estômago há hemorragia com necrose e inflamação, processo que se propaga ao duodeno. Focos necróticos são sempre observados no intestino grosso. Estes focos necróticos se localizam às vezes debaixo da mucosa intestinal formando pequenos nódulos de cor acinzentada; outras vezes são maiores, aparecendo na musculatura lisa, atingindo até o tamanho dos carbúnculos que aparecem na infecção pelo *Bacillus anthracis*; há depois necrose. Os gânglios linfáticos são tumefeitos e hemorrágicos.

**Histopatologia.** Nos diferentes órgãos nas hemorragias, nas paredes dos pequenos vasos sanguíneos, no epitélio dos rins e constantemente nos gânglios linfáticos, encontram-se aglomerados de pigmento originário do fungo.

Além disso, cortes histológicos revelam micélios Gram positivos nos focos necróticos particularmente nos limites do tecido normal com o patológico; estes micélios são vistos no intestino com maior freqüência.

*Stachybotrys alterans* é um cogumelo do grupo dos destruidores da celulose. Existem duas formas morfológicamente inseparáveis: uma patogênica e outra apatogênica.

O fungo se desenvolve na celulose das plantas mortas, nas folhas úmidas, no feno, nos restolhos e nos pastos ceifados. Amostras patogênicas foram também isoladas do solo em propriedades onde ocorreu a doença. Uma fonte do cogumelo é o estérco.

O fungo é muito resistente e os esporos não perdem sua virulência durante o inverno.

Gramas e cereais, em regiões contaminadas são atacadas pelo fungo, já durante o crescimento.

Se o feno ou a palha forem depositados em medas e houver bastante umidade e calor, o fungo se desenvolve dos esporos com facilidade.

Por outro lado, o solo pode contaminar-se por meio de restos de feno e de palha infectados.

Uma condição muito importante para o desenvolvimento do *Stachybotrys* é a umidade e o calor que se formam dentro das medas. Nos alimentos secos os esporos não se desenvolvem. Portanto, tais alimentos são inócuos para os animais.

O melhor meio de combate à doença consiste em se controlar rigorosamente o feno e a palha para se eliminar porções afetadas pelo bolor, bem como as porções podres e estragadas.

A forma patogênica se diferencia da apatogênica por elaborar aquela uma toxina nos esporos e nos micélios.

A toxina é termo-estável e insolúvel n'água.

Mesmo elaborada fora do organismo animal, a toxina quando ingerida junto com alimentos, provoca ainda em quantidades pequenas, inflamações locais e hemorragias seguidas de necrose.

A doença pode ser reproduzida experimentalmente em cavalos, contaminando-se os alimentos com culturas puras do fungo ou alimentando-se estes animais com o feno em que o cogumelo cresceu.

Uma dermatite pode se desenvolver em pessoas manipulando o feno mofado; uma afecção idêntica à do cavalo é mencionada em pessoas que ingeriram cereais mofados.

**Combate.** Colheita rápida, para se evitar a umidade no feno ou nos cereais; arar o campo; debulhar rapidamente os cereais, para se evitar o desenvolvimento do fungo. Na palha atacada o fungo forma uma camada preta lembrando a fuligem. Portanto, eliminar feno e palha enegrecidos.

É importante reconhecer a doença no início, pelo exame minucioso dos lábios, da mucosa gengival e da língua; encontrando-se ainda no início as lesões citadas, a mudança da alimentação redonda em rápidas melhoras.

Na terapêutica, cloreto de cálcio e adrenalina; terapia sintomática.

#### OUTRAS MICOTOXICOSES

Outras micotoxicoses merecedoras pelo menos de menção seriam ainda:

##### *Ergotismo*

Ergotismo que resulta da ingestão da ergotina, alcalóide que se forma quando o fungo *Claviceps purpurea* parasita o centeio.

##### *Claviceps paspalis*

A micotoxicose por *Claviceps paspalis*, cogumelo que parasita o capim "dallis" (*Paspalum dilatatum*), em certas regiões do sul dos Estados Unidos. O esporão é bem menor que o do centeio e é de cor parda, muitas vezes. Os bovinos intoxicados têm irritabilidade e até mesmo agressividade, ao lado da incoordenação muscular.

##### *Penicillium islandicum*

A micotoxicose por *Penicillium islandicum*, cogumelo que elabora duas hepatotoxinas ao contaminar o arroz; constituiu tal micotoxicose problema de relevo no Japão, poucos anos atrás. O *Penicillium islandicum* foi isolado de uma cevada tóxica na Inglaterra e o seu micélio dessecado mostrou-se tóxico para patinhos.

##### *Eczema facial*

Eczema facial, micotoxicose por *Pithomyces chartarum* (*Sporidesmium bakeri*). Trata-se, o eczema facial, de importante afecção de carneiros da Nova Zelândia. A toxina deste fungo, que contamina pastagens, lesa gravemente os dutos hepáticos ocluindo-os. Em consequência de tal oclusão, não há eliminação de filoe retrina, substância fotossensibilizadora formada a custa da clorofila. A filoe retrina então retida determina fotossensibilidade no animal.

##### *Aspergillus* spp.

O *Aspergillus fumigatus* tem se mostrado tóxico ao contaminar alimentos e o *A. clavatus* foi isolado de ração prensada que administrada a bezerro determinou-lhe hiperqueratose; milho contaminado pelo *A. clavatus* quando moído e dado a bezerras produz-lhes aquela doença.

##### *Fusarium* spp.

Representantes do gênero *Fusarium* têm demonstrado toxicidade para patinhos e camundongos.

##### *Amanita* spp.

Por fim, os cogumelos *Amanita phalloides* e *A. verna* que freqüentemente intoxicam o homem em certas regiões, podem também determinar toxicoses em bovinos que pastam em regiões úmidas e quentes, nas quais pululam aqueles cogumelos. Os animais mostram sinais de dor na defecação, eversão e ulceração da mucosa retal, além de outros sintomas.

#### AFLATOXICOSE

A história da aflatoxicose começa no início de 1960, quando criadores de perus na Inglaterra verificaram que as rações administradas a estas aves não eram muito bem recebidas pelas mesmas.

Em junho, relatórios enviados das granjas indicavam elevada mortandade nestes animais e em julho, tentativa de isolamento de organismos vivos dos animais doentes, falharam. Foi a afecção denominada doença X dos perus, por ser desconhecida sua etiologia.

A mortalidade era de tal gravidade que granjas com 1.000 perus, perderam 800, dos quais todos com idade compreendidas entre dois e oito semanas. Não houve descrições autênticas de perdas de aves com idades superiores a 18-20 semanas.

Quase todos os casos ocorreram num raio de 80-100 milhas de Londres.

A princípio somente perus foram comprometidos porém mais tarde patos e faisões foram também vítimas pela doença. A maior parte dos casos ocorreu entre a primeira semana de maio e o fim de agosto.

Calcula-se que mais de 100 mil perus tenham morrido pela afecção.

Os exames "post mortem" demonstravam: congestão renal e alterações hepáticas traduzidas por hemorragias, congestão e necrose. O sangue se mostrava mais fluido que o normal.

Os antibióticos foram tentados no tratamento, mas só havia resposta à terapêutica quando se introduziam modificações na alimentação ou nas condições de criação.

Os primeiros testes realizados com a ração para a caracterização de substâncias tóxicas na mesma visaram:

1.º) Pesquisa de ingredientes raros na fórmula, tais como farinha de peixe importada ou proteína vegetal contendo um possível excesso de fibra ou areia.

2.º) Presença de ingredientes tóxicos tais como: alcalóides, sementes de algodão ou de mamona.

3.º) Excesso de determinadas substâncias como o sulfato de cobre ou carbonato de zinco.

4.º) Contaminação por substâncias tóxicas como mercúrio, chumbo ou rodenticidas.

5.º) Um excesso de ácidos graxos livres.

6.º) Contaminação das farinhas por inseticidas, fungicidas ou quaisquer outros produtos tóxicos, para combater pragas.

Tôdas as pesquisas foram negativas para aqueles elementos.

O problema continuava na obscuridade quando 6 casos da doença apareceram na região de Cheshire, após os animais ingerirem alimentos manufaturados em Selby. Verificou-se então que o ingrediente comum no preparo das rações dos moinhos londrinos e de Selby, era farinha de amendoim importada do Brasil.

Nesta ocasião, pequenos industriais de rações dos condados do Leste começaram a ter o mesmo problema e do mesmo modo estavam começando a usar a farinha de amendoim de procedência brasileira.

As primeiras importações de farinha de amendoim brasileira se deram na Inglaterra em 1960, quando mais de 5.000 toneladas foram adquiridas.

As análises químicas mostraram que ela obedecia a padrões exigidos e o exame microscópico da mesma não revelava qualquer quantidade anormal de farinha de mamona.

Produtos do cacau eventualmente adicionados à farinha de amendoim foram suspeitados de ocorrerem em tais farinhas, pois as mesmas revelavam 0,004 a 0,07 de teobromina, indício de uma adição de 5% de cascas de cacau, aproximadamente.

Ensaio administrando-se cafeína, uréia, café, casca de cacau e farinha de café, nas rações foram efetuados e alguma toxicidade foi observada em tais substâncias porém não havia nos animais quadros anátomo-patológicos da doença X.

Verificaram ainda os pesquisadores ingleses que as rações suspeitas eram ainda mais tóxicas, se lhes fôsse adicionada sulfaquinoxalina.

Investigações realizadas ainda na Inglaterra mostraram então que o fator responsável pela perda de animais não era originário propriamente do amendoim, porém de uma estirpe tóxica do *Aspergillus flavus* que contaminava o seu grão. O fator tóxico de tal cogumelo foi denominado "Aflatoxina".

Apenas determinadas linhagens de *A. flavus* elaboram a aflatoxina.

O *A. flavus* é um mófo comum que pode ser isolado de alimentos secos e armazenados, bem como dos solos tropicais. Cresce rapidamente, porém necessita mais umidade que o comum dos mófos. Desenvolve-se bem em temperaturas tropicais (30.ºC) e com umidade relativa de 80-85%, ou mais.

Os caroços do amendoim e a sua farinha desengordurada oferecem condições muito propícias ao desenvolvimento do *A. flavus*.

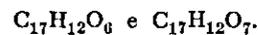
A semente esterelizada do amendoim tem sido utilizada como meio de cultura para este cogumelo.

Foram observadas na Inglaterra, partidas tóxicas de amendoim, procedentes da Índia, após a importação das amostras tóxicas brasileiras.

Em temperaturas tropicais, o *Aspergillus flavus* pode crescer em caroços descorticados, quando sua umidade excede de 9%, ou na farinha ou torta quando tal grau de umidade atinge 16% aproximadamente.

A toxicidade parece se desenvolver principalmente após a retirada dos grãos do solo, sobretudo se a secagem não é rápida e completa e se a casca do caroço é lesada. Há indícios de que as nozes podem se tornar tóxicas ainda no solo, se elas são aí deixadas além da maturidade ou se as cascas são lesadas. A toxina pode se formar também durante o armazenamento e o transporte, desde que o teor de umidade do produto ultrapasse 9%.

A química da aflatoxina. É a aflatoxina um complexo de substâncias muito afins estruturalmente; há pelo menos quatro componentes, dos quais dois bem conhecidos e isolados em quantidades que permitiram a sua análise física e química — são as aflatoxina B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>, cujas fórmulas atribuídas são respectivamente:



Têm uma característica fluorescência à luz ultra-violeta, a qual é paralela à sua toxicidade para

o patinho, animal de maior sensibilidade a esta toxina.

A aflatoxina B<sub>1</sub> é de grande toxicidade e a DL<sub>50</sub>, isto é a dose letal mínima para matar metade dos animais em experiência, é menos de 20 µg para patinhos Khaki-Campbell de um dia de idade. A aflatoxina G<sub>1</sub> é menos tóxica.

Têm as aflatoxinas pesos moleculares baixos, como tôdas as toxinas de cogumelos, ao contrário das toxinas bacterianas (botulínica, etc.) que têm elevado pêso molecular.

Pode ser extraída por metanol a quente. É possível a concentração do fator tóxico presente no metanol a quente, por meio de suspensão em água e posterior extração com clorofórmio. O resíduo solúvel em clorofórmio é suspenso em metanol aquoso e libertado da gordura por éter de petróleo. A solução aquoso-metanólica contém a toxina e a suspensão aquosa obtida após a remoção do metanol por destilação, pode ser administrada a patinhos.

As tortas ou farinhas tóxicas podem ser ensaiadas diretamente em patinhos por meio de sonda esofágica (Theodossíades 1963).

Bovinos, suínos, patos e perus são sensíveis à aflatoxina. A sensibilidade varia de espécie para espécie, como é de se esperar. Os animais jovens são bem mais sensíveis.

Entre as aves, os patos são de grande sensibilidade, como vimos anteriormente.

Os pintos são muito resistentes.

Entre os mamíferos, são particularmente sensíveis os leitões; os cordeiros mostram pouca suscetibilidade.

A aflatoxina é uma típica substância hepatotóxica.

Lancaster *et al.* (1962) observaram cânceres primários do fígado de ratos que receberam por longos períodos (6 meses), pequenas quantidades de farinha de amendoim tóxica. Cada animal recebeu nesta experiência menos de 7 mg da toxina, segundo os cálculos dos autores.

Êstes trabalhos foram confirmados por Shoental (1961).

*Aspectos agrícolas do problema.* Como o *A. flavus* só prospera quando há umidade suficiente, a produção de aflatoxina começa antes das operações de dessecação da colheita, as quais freqüentemente reduzem esta umidade a grau abaixo do nível crítico. O mófo pode evidentemente desenvolver-se em fases posteriormente, se a semente, a torta ou a farinha adquirem de novo umidade suficiente. Uma dessecação posterior não reduz o conteúdo da aflatoxina,

uma vez que ela é estável em condições normais de dessecação.

Embora o teor da umidade da semente ainda no solo seja elevado (no mínimo 25%) parece que o *Aspergillus* aí não desenvolve. Admite-se a ocorrência de um mecanismo de defesa natural, suplementado por barreiras opostas pela película íntegra das estruturas vegetais. Se a semente fica entretanto no solo após sua maturação, pode ocorrer a invasão pelo cogumelo; os insetos talvez contribuam para tal contaminação, perfurando os revestimentos naturais.

Talvez a fase de maior vulnerabilidade da semente ao cogumelo é a que se segue à colheita, quando ela conserva um alto grau de umidade; nesta fase, se as condições atmosféricas e os processos de colheita não favorecerem uma rápida dessecação que evite a infecção pelo fungo, esta fatalmente se dá.

Em determinadas regiões, a colheita é realizada nas épocas de chuvas, em outras, os lavradores não promovem uma completa dessecação da semente. Em ambos os casos, especialmente quando êstes fatores se combinam, é muito grande o risco de contaminação pelo cogumelo.

Parece que só uma pequena proporção de grãos se infecta; os fatores responsáveis por esta resistência são desconhecidos. A deterioração parece favorecer a contaminação, por permitir a entrada de esporos do mófo.

A prática de se descascar o amendoim antes de secá-lo é muito perigosa; do mesmo modo é perigosa a prática de se umedecer a vagem antes de se descascá-la. É igualmente contraindicado o umedecimento da vagem durante a trituração.

Afirma Spensley (1963) que quando o amendoim é colhido e secado como Deus manda, o grão não oferece perigo, nem são perigosas suas farinhas ou tortas, a não ser que condições de armazenamento permitam que se estabeleça um grau de umidade acima do nível crítico; assim nos lugares em que a umidade relativa da atmosfera é em certas épocas do ano, superior a 85%, é necessário se assegurar um armazenamento em condições adequadas de umidade. O mesmo se aplica ao transporte.

*Aspectos comerciais do problema.* Os alimentos à base do amendoim são de grande valor pelo seu elevado teor protéico e seu baixo custo.

A Inglaterra importou em 1961, 600 mil toneladas de tal produto, no valor de 18 milhões de libras; metade dêste amendoim procedia da Índia. Trata-se esta leguminosa de produto de razoável importância para a alimentação do homem e dos animais.

De acordo com Spensley (1963) a farinha de amendoim constitui excelente alimento complementar para crianças e contém 50% de proteínas. A proteína do amendoim associada com quantidades pequenas de outra proteína, a caseína, por exemplo, tem elevado valor nutritivo e poderia ser importante fator como proteína vegetal concentrada na luta contra a fome em certas regiões do mundo.

Em consequência da toxicidade das farinhas brasileiras, o governo inglês proibiu a importação das mesmas.

Após a epizootia de 1960, a indústria britânica fez uso imediato dos conhecimentos obtidos pela ciência, em torno da aflatoxina. Foram adotadas medidas de fiscalização das tortas e farinhas de amendoim. Todas as consignações deveriam ser analisadas e o amendoim contaminado ao entrar nas rações, levava-se em conta o conteúdo em aflatoxina e o animal a que se destinava tal ração. Com estas medidas a doença X dos perus se reduziu, bem como as afecções em mamíferos, atribuídas à aflatoxina.

Os óleos refinados do amendoim são utilizados na fabricação da margarina, bem como no preparo dos alimentos, estão sempre livres da toxina, mesmo que procedentes de sementes contaminadas, uma vez que os álcalis empregados na refinação dos óleos destroem tal toxina.

O amendoim consumido em grãos na Inglaterra é selecionado a mão. As sementes deterioradas, descoradas ou mofadas são eliminadas.

A manteiga de amendoim é fabricada com sementes assim selecionadas.

Na Índia fabrica-se no momento um produto alimentar baseado na farinha de amendoim. Sua atoxicidade é obtida selecionando-se os grãos a mão, antes de moê-los; para uma maior garantia, foram introduzidas as provas de evidenciação da aflatoxina.

*Principais doenças dos animais produzidas pela aflatoxina.*

*Hepatite exsudativa da cobaia.* Afecção descrita por Paget (1954). Caracteriza-se fundamentalmente por ascite e edema. O tecido subcutâneo é destendido por material gelatinoso de consistência quase seca; os líquidos fluem mais ou menos 1-2 minutos após a seção dos tecidos.

O líquido ascítico é claro.

Microscópicamente há infiltração dos espaços-porta do parênquima hepático por plasmócitos, linfócitos e polimorfonucleares.

Nos gânglios hipertrofiados do mesentério, hiperplasia reticular dos sinusoides.

No pâncreas, hipertrofia e hiperplasia das ilhotas de Langerhans.

A afecção está ligada à ingestão de amendoim tóxico existente nas rações.

*Hepatite X do cão.* Trata-se de grave hepatite do cão, a qual se traduz fundamentalmente do ponto de vista clínico por icterícia e do ponto de vista anátomo-patológico por lesões necróticas e regenerativas do parênquima hepático. O quadro anátomo-patológico lembra o da hepatite epidêmica do homem.

Tal afecção foi descrita originalmente por nós no Rio de Janeiro (Andrade dos Santos 1950). Seibold & Bailey (1952) registraram-na com caráter enzoótico em Alabama, relacionando o aparecimento da mesma com a ingestão de alimentos enlatados próprios para cães. A doença foi descrita no Uruguai por Cristi (1954), acometendo cães e gatos. Os animais apresentavam além de hepatite, perturbações digestivas e nervosas.

Mais tarde, voltamos a observar a afecção em nosso País; nesta oportunidade, consignamos a doença com caráter epizootico, na cidade de Niterói, em animais alimentados com enlatados (Andrade dos Santos & Xavier, dados não publicados).

Está evidenciado hoje que esta hepatite está ligada à ingestão de produtos de milho contaminados pelo *A. flavus*, e participantes de enlatados para a alimentação de cães.

*Doença X do peru.* Acomete principalmente os jovens, mas mesmo aves com idades superiores a 20 semanas têm sido acometidas pela afecção.

As maiores perdas ocorrem em aves com quatro semanas de idade.

As aves mostram letargia, inapetência, depravação do apetite. Pouca tendência ao movimento. Ganhos de peso retardados; plumagem pobre. Ocasionalmente ligeira diarreia amarelada.

As mortes ocorrem muitas vezes sem sintomas preliminares e as aves morrem em boas condições de nutrição.

Em algumas, opistótonos e espasmos dos músculos do pescoço.

As alterações encontradas à necropsia de aves mortas repentinamente são: congestão total do fígado ou necrose focal com áreas de hemorragias. Em casos de evolução mais prolongada, o fígado se mostra pálido e endurecido. Em algumas aves o fígado se apresenta pardo-claro, pequeno e cirrótico.

Rins tumefeitos e congestos. Trato intestinal com inflamação catarral e às vezes hemorrágico.

Complicações de aerocistites, aspergilose, monilíose.

A histopatologia do fígado demonstra: degeneração parenquimatosa da célula hepática, com megacitose, proliferação de dutos e de parênquima.

*Distrofia hepática em bovinos.* Surtos de intoxicação por aflatoxina foram registrados na Inglaterra em 1960-1961. É digno de menção o fato de ter esta doença do ponto de vista clínico e anátomo-patológico, quadros idênticos aos da intoxicação por vegetais do gênero *Senecio*.

*Distrofia hepática em suínos.* Surtos de intoxicação por aflatoxina têm sido registrados na Inglaterra entre suínos bem como em Madagascar e em nosso País. As observações feitas em Madagascar pelo pesquisador Raynaud (1963) indicam que muitos animais afetados têm icterícia e como lesões ora uma cirrose hipertrófica nodular, ora uma cirrose icterógena granular, ora uma hepatite superaguda, ora uma necrose total do fígado, ou uma cirrose atrofica ascitogena.

Harding *et al.* (1963) provocando o envenenamento pelo amendoim tóxico em suínos, o qual entrava nas rações nas proporções de 17,5 a 20%, observaram além de outras alterações hepáticas, a ocorrência de inclusões anfófilas nos núcleos das células hepáticas. As lesões eram algumas vezes acompanhadas de elevação da transaminase oxilo acética glutâmica no soro, da fosfatase alcalina, da concentração de gordura hepática, da redução de vitamina A no fígado e da redução da proporção tireóide-peso corpóreo.

*A doença no Brasil.* Segundo Raimo *et al.* (1961), durante os anos de 1958 e 1959, foi observada uma série de anomalias em criações de aves no Estado de São Paulo, caracterizada pela queda progressiva da eclosão de ovos incubados e baixo desenvolvimento dos frangos de corte, mas sem queda sensível de postura. Em 1960 foi verificado que a causa dessas anomalias residia no farelo de amendoim utilizado nas rações. Retirado esse ingrediente, a eclosão e o desenvolvimento lentamente voltaram ao normal.

Provas efetuadas pela Seção de Avicultura do Antigo Departamento de Produção Animal (DPA), do Ministério da Agricultura, confirmaram a ação prejudicial do farelo de amendoim na eclosão dos ovos e no desenvolvimento das aves jovens. Por isso, o DPA constituiu uma comissão mista, para estudar as causas da toxicidade dos farelos de amendoim.

As provas programadas pela comissão eliminaram como causas de toxicidade de tais rações, os inseticidas de ação residual, os fosforados e clorados,

os solventes de extração de óleos, os alcalóides (teobromina e cafeína) e a uréia.

Como nem todas as partidas de farelo apresentassem toxicidade, foram realizadas experiências com a finalidade de se estabelecer tanto quanto possível métodos rápidos de identificação das partidas que mostrassem características de toxicidade.

Para esse fim foram utilizados marrecos jovens, tidos como animais muito sensíveis e farelos de quatro origens, sendo um dos Estados Unidos, conhecido como inócuo.

Foi utilizada a proporção de 6,5% de farelo numa ração inicial.

No 2.º ensaio foram utilizados extratos dessas tortas, segundo o método de Allcroft *et al.* (1962), administrando-se o material por via oral a marrecos, com a finalidade de tornar a prova mais rápida.

Após três semanas, no primeiro ensaio o lote testemunha não revelava mortalidade, ao passo que os lotes experimentais apresentavam índices de 80-100% de letalidade. O exame histopatológico revelou degeneração gordurosa do fígado, necrobiose das células dos túbulos renais, efeitos tóxicos cumulativos encontrados na doença X.

Depois de 3 dias, no 2.º teste, os extratos dos farelos tóxicos determinaram 100% de mortalidade nos marrecos.

Os dados revelam que a técnica é exequível em nossas condições permitindo realizar permanentemente testes de identificação de partidas de amendoim com características tóxicas.

Verificou Amaral (1961) em São Paulo que o farelo de amendoim era responsável pela morte de suínos.

Curial (1961) realizando no Paraná o estudo anátomo-patológico de uma doença em suínos caracterizada por hepatite, admitiu tratar-se de processo tóxico provavelmente decorrente da ingestão de torta de amendoim.

Como nos referimos anteriormente, tivemos ocasião de observar em nosso meio a hepatite X do cão, doença que hoje é atribuída à aflatoxina.

Baseando em dados clínicos, epizoóticos e anátomo-patológicos, Brada (1964), trabalhando no Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul, Km 47, diagnosticou em nosso meio, casos de doença X em perus.

Admitimos que surtos de hepatites epizoóticas ocorrendo em patinhos em nosso País, diagnosticados como determinados pelo vírus da hepatite dos patos, sem que entretanto haja isolamento deste vírus, sejam na realidade produzidos pela aflatoxina.

## AFLATOXINA E CÂNCER HEPÁTICO

Uma vez que em condições experimentais, Lancaster *et al.* (1962) como Schoental (1961) obtiveram tumores hepáticos em ratos recebendo farinhas de amendoim tóxicas, especula-se se tumores hepáticos que às vezes têm o caráter epidêmico, ou endêmico também não possam ser determinados pela ingestão da aflatoxina. A literatura especializada registra em quatro espécies animais tais tumores com caráter epidêmico. São eles; o homem, o coelho, o urso e a truta.

No homem, o câncer hepático incide de maneira muito apreciável entre os pretos, do grupo Bantu e em outros grupos, vivendo na África. Caem tais cifras de incidência para valores normais quando estes indivíduos, os Bantus por exemplo, migram para outras regiões; assim a ocorrência de neoplasias hepáticas é baixa nos Bantus vivendo nos Estados Unidos. Pensam alguns autores que a alta ocorrência do câncer primário do fígado nestes indivíduos, quando vivendo na África, poderia estar ligada a fatores dietéticos. Teriam eles distrofias hepáticas em consequência das deficiências protéicas aí tão comuns e tais distrofias se complicariam de neoplasias do fígado. Entretanto, com o conhecimento da aflatoxina, as suspeitas se voltam para ela. As toxinas do *A. flavus* seriam as responsáveis pelos cânceres do fígado dos africanos, isto pelo consumo apreciável que fazem do amendoim e de outros produtos vegetais; estes produtos nas regiões tropicais da África podem facilmente se contaminar pelo cogumelo, em virtude de condições climáticas favoráveis.

Em dois trabalhos referimo-nos a um câncer hepático enzoótico em coelhos, em nosso País. Embora aventássemos a hipótese de um vírus ser o responsável por tal tumor, que incidiu em cifras impressionantes na criação em que procedemos aquelas observações, não desprezamos a possibilidade da aflatoxina ser a causa de tais blastomas, pois a farinha de amendoim participou em algumas ocasiões da dieta daqueles roedores.

A truta (*Salmo gairdnerii*) criada em tanques nos Estados Unidos e na Europa, sofre de um câncer primário do fígado, de caráter epizootico, que em algumas circunstâncias afeta praticamente 100% dos peixes com mais de três anos de idade. O tumor invade diretamente os músculos esqueléticos adjacentes e determina metástases esplênicas e renais. Como tais peixes são alimentados com produtos industrializados e o tumor deixa de aparecer quando se suspende a alimentação da farinha de semente de algodão, pode-se admitir a contaminação da mesma pelo

*A. flavus* embora não se possa deixar de considerar a possibilidade da ação hepatotóxica e talvez secundariamente cancerígena de frações de gossipol porventura existentes nestas farinhas.

Finalmente, em período de seis anos Dorn (1963) observou cinco casos de carcinomas biliares e hepáticos em ursos (*Ursus horribilis* e *Melursus ursinus*), vivendo todos na mesma gruta, no Jardim Zoológico de San Diego, Califórnia. Como tais animais recebessem em suas dietas rações comerciais para cães e considerando-se que tais alimentos podem conter aflatoxina, como vimos anteriormente, as neoplasias hepáticas destes ursos podem do mesmo modo estar correlacionadas com as toxinas do *A. flavus*.

*Medidas profiláticas.* As seguintes medidas são aconselhadas na prevenção da contaminação do amendoim e seus derivados pelo *Aspergillus flavus*.

a) *Na colheita do amendoim.* Lesar o menor possível a casca do vegetal. As vagens devem ser colhidas quando no ponto de maturação. Não devem ser colhidas nem antes de amadurecidas, nem após a maturação. As nozes de plantas doentes devem ser consideradas suspeitas. A colheita deve ser efetuada tanto quanto possível na estação seca.

b) *Na secagem.* Os caroços não devem ser descortçados antes da secagem, a menos que isto seja feito rapidamente em secadores artificiais. O manuseio para a secagem deve danificar o vegetal o mínimo possível nas regiões úmidas em que as nozes são colhidas no fim das chuvas, e o uso de secadores especiais com chama, apressa com vantagem estas secagem. A colocação dos vegetais em prateleiras de abrigos expostos ao vento, ou a colocação do vegetal em bandejas para secagem, as quais possam ficar protegidas da chuva, são boas práticas.

Quando as medidas de secagem são feitas no campo, estas deveriam ser isoladas do solo e protegidas da chuva. Elas deveriam ter forma e tamanho tais que permitissem uma secagem tão rápida quanto possível.

Um conteúdo de cerca de 9% de umidade na amêndoa é o mínimo que permite a população do *A. flavus*. Por medida de segurança devem ser mantidos níveis mais baixos ainda (7% por exemplo). Com este baixo grau de umidade, o risco de outras formas de deterioração como a representada pelo excesso de acidez, fica muito diminuído.

c) *No descansar.* Separar as sementes com cascas lesadas para serem processadas separadamente (o que nem sempre é prático). Ao mesmo tempo, todas as sementes descoradas enrugadas e obviamente mofadas deverão ser eliminadas. Este trabalho é feito

à mão. Na Inglaterra as vêzes para consumo humano são submetidas a uma seleção manual.

d) *No armazenamento e transporte.* Tôdas as precauções devem ser tomadas para que aqueles graus críticos de umidade não reapareçam, assim um elevado grau higroscópico da atmosfera, as chuvas, etc., devem ser evitados.

e) *Antes do uso para fins alimentares.* Partidas de nozes descoradas e mofadas não deverão evidentemente ser misturadas com aquelas normais. As sementes rejeitadas podem, sem perigo, ser empregadas na fabricação do óleo refinado. Entretanto as tortas de tais sementes alteradas são potencialmente portadoras de grande toxicidade e não devem ser levadas ao consumo humano. Para o consumo animal, estas tortas não deverão igualmente ser empregadas, a não ser que o nível de sua toxicidade seja determinado.

A cocção não desintoxica o produto; não se conhecem antitoxinas contra a aflatoxina.

#### DISCUSSÃO

Desde que em condições experimentais, Lancaster *et al.* (1962) bem como Schoental (1961) conseguiram neoplasias hepáticas em ratos recebendo farinha de amendoim tóxicas, deve-se pensar na possibilidade de tumores do fígado, que às vêzes têm o caráter epidêmico ou endêmico, serem determinados pela ingestão de aflatoxina.

A literatura menciona em quatro espécies animais, tais tumores com caráter epidêmico. São elas: o homem, o coelho, o urso e a truta.

No homem, o câncer hepático incide de maneira muito apreciável entre os negros do grupo Bantu e mesmo em outros grupos, quando vivendo na África; tal cifra de incidência cai para valores considerados normais, quando estes indivíduos migram para outras regiões. Assim a ocorrência de neoplasias hepáticas é baixa nos Bantus vivendo nos Estados Unidos. As toxinas do *A. flavus* poderiam ser responsabilizadas por tais cânceres, isto pelo consumo apreciável que tais povos fazem do amendoim e pela facilidade que os produtos deste vegetal se contaminam pelo *Aspergillus*, nas condições climáticas de certas regiões da África.

Em dois trabalhos referimo-nos a um câncer hepático enzoótico em coelhos, em nosso País. Embora aventássemos a hipótese de um vírus ser o responsável por tal tumor, não desprezamos a possibilidade da aflatoxina ser a causa desta neoplasias, pois a farinha de amendoim participou em algumas ocasiões da dieta daqueles roedores.

A truta (*Salmo gairdnerii*), criada em tanques nos Estados Unidos e na Europa, sofre de um câncer primário do fígado que em algumas circunstâncias, afeta praticamente 100% dos peixes com mais de três anos de idade. Como nestes peixes o tumor deixa de aparecer quando se retira da alimentação a farinha de semente de algodão, pode-se admitir a contaminação da mesma por *A. flavus*, embora se deva considerar também a possibilidade da ação hepatotóxica e talvez secundariamente cancerígena de frações de gossípol, eventualmente existentes nestas farinhas.

Por fim, em determinado período, Dorn (1963) observou cinco casos de carcinomas biliares e hepáticos em Ursos (*Ursus horribilis* e *Melursus ursinus*), vivendo todos na mesma gruta em Jardim Zoológico. Como tais animais recebessem em suas dietas rações comerciais para cães e considerando-se que estes alimentos podem conter aflatoxina, as neoplasias hepáticas destes ursos podem do mesmo modo estar correlacionadas com as toxinas do *A. flavus*.

#### REFERÊNCIAS

- Alcroft, R. & Carnaghan, R. B. A. 1962. Vet. Rec. 74: 863-925.
- Amaral, L. B. S. 1961. *Biológico* 27(3):63.
- Andrade dos Santos, J. 1950. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.* 18:73-76.
- Andrade dos Santos, J. & Xavier, F. M. Dados não publicados.
- Andrade dos Santos, J. 1961. *Arq. Inst. Biol. Animal, Rio de Janeiro*, 4:133-167.
- Andrade dos Santos, J. 1964. Trabalho não publicado.
- Anônimo. *The Agricultural Merchant* (fev.):85-87.
- Brada, W. 1964. Comunicação pessoal.
- Burton, H. A. 1944. *Vet. Med.* 39:290.
- Chaves, R. L. 1950. *Rev. Mil. Rem. Vet.* 10:199-215.
- Cristi, G. A. 1954. *An. Fac. Vet. Rep. Oriental do Uruguai* 6(1):123-138.
- Curial, O. 1961. Tese doutoramento Escola Sup. Agr. Vet., Curitiba, Paraná.
- Dillon, B. E. 1955. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 126:136.
- Dorn, C. R. 1963. *California State Department of Public Health Technical Report* n.º 2.
- Drobotko, V. G. 1955. *Cit. for Emmons, C. W.*, p. 57. In: Brandley, C. A. & Jungherr, E. L. (ed.). *Advances in Vet. Sci.* Vol. 2. Academic Press Inc., New York.
- Forgacs, J. *et al.* 1953. *Vet. Med.* 48:410-411.
- Harding, J. D. *et al.* 1963. *Res. Vet. Sci.* 4(2):217-229.
- Hueper, W. C. & Payne, W. W. 1961. *J. Nat. Cancer Inst.* 27(5):1123-1143.
- Iwanoff, X. *et al.* 1958. Sumário in *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 133(7):
- Lancaster, M. C. *et al.* 1962. *Nature, Lond.*, 195:1062.
- Onegov, A. P. 1949. *Veteriniya* 26:41-43.
- Paget, J. 1954. *Path. Bact.* 67:393.

- Pieroy, P. L. *et al.* 1944. J. Am. Vet. Med. Assoc. 105: 206-208.
- Raimo, H. F. *et al.* 1961. Nota prévia ao II Congresso Brasileiro de Toxicologia, P. Alegre, Rio Grande do Sul.
- Raynaud, J. P. 1963. Revue d'Élevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux 16(1):23-32.
- Sargeant, K. *et al.* 1961. Vet. Rec. 73:765.
- Sargeant, K. *et al.* 1961. Vet. Rec. 73:1219.
- Sargeant, K. *et al.* 1961. Nature, Lond., 193:1096.
- Sargeant, K. & Carnaghan, R. B. A. 1963. Brit. Vet. J. 119(4):178-184.
- Schoental, R. 1961. Brit. J. Cancer 15:812.
- Schwarte, L. H. *et al.* 1937. J. Am. Vet. Med. Assoc. 90: 76-85.
- Seibold, H. R. & Bailey, W. S. 1962. J. Am. Vet. Med. Assoc. 121(906):201-206.
- Simms, B. T. 1945. Auburn Vet. Summer.
- Sippel, W. L. *et al.* 1953. Proc. Am. Vet. Med. Assoc. 174-181.
- Spensley, P. C. 1963. Endeavour 22(86):75-79.
- Theodossades, G. 1963. Revue d'Élevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux 16(2):229-236.
- Uraguchi, K. *et al.* 1961. J. Exp. Med. 31:19.
- Wetzel, R. & Elksnitis, W. 1955. Cit for Emmons, C. W., p. 57. In: Bradley, C. A. & Jungherr, E. L. (ed.). Advances in Vet. Sci. Vol. 2. Academic Press Inc., New York.
- Wolff, H. & Jacson, E. W. 1963. Science 142(3593): 676-678.

## AFLATOXIN AND LIVER CANCER

### *Abstract*

The author reviews the principal animal and human micotoxicosis and focalizes the problem of aflatoxin with special emphasis on case history, pathogenesis and prophylaxis. The relationship between aflatoxin and epizootic cancer studied in rabbits is shown, besides an attempt to establish a correlation between aflatoxicosis and certain primary liver tumors of animals and man.