



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM
ALIMENTOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL
ENTRE 1998 E 2013**

Lucas Pinto da Silva

**Belo Horizonte-MG
2014**



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM
ALIMENTOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL
ENTRE 1998 E 2013**

Lucas Pinto da Silva

Monografia apresentada ao Curso de Química Tecnológica do CEFET-MG como parte das exigências da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II).

Orientador: Prof. Dr. Claudinei Rezende Calado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Claudinei Rezende Calado (orientador)

Prof. Dr. Ildefonso Binatti

Prof. Dr. Cleverson Fernando Garcia

Monografia aprovada em 12 de agosto de 2014

**Belo Horizonte-MG
2014**

AGRADECIMENTOS

É como elemento finalizador de uma etapa de grande importância em minha formação pessoal e acadêmica, e com a esperança de apresentar uma síntese das qualidades reunidas durante a formação que recebi desta instituição, na intenção de fazer justiça aos alunos que me precederam neste departamento assim como os que estão por vir, apresento com orgulho este Trabalho de Conclusão de Curso.

Mesmo convicto que seja este um trabalho categoricamente individual, em virtude de seu caráter educacional e acadêmico. É notório que, em virtude destes mesmos argumentos, há influências e estímulos provenientes de diversas fontes que devem aqui ser mencionadas.

Desta forma, é com satisfação que expresso meus sinceros agradecimentos aos meus pais, Maurício e Nilda, fundamentais na construção do caráter. A minha mãe em especial pela postura reflexiva e ponderada que norteiam suas ações.

Ao meu pai, um homem além de qualquer louro que encarna a bravura e a coragem em uma personificação heroica para seus filhos, o único capaz de conduzir seus rebentos através dos tenebrosos desafios que compõem a construção humana. É sob minha concepção algo além do efêmero, formado pelo sacrifício, altruísmo e inabalável corretude de caráter que marcam a vida de quem quer que tenha o prazer de sua companhia. Tenho a sorte de herdar-te a paixão pela ciência, e com ventura, o legado de honestidade, seriedade e garra.

Á meus irmãos, Juliana, Miguel e Guilherme, que colaboram cada um com suas peculiaridades, na construção uma família generosa, que tem em sua unidade sua pedra fundamental e é coluna para todos nos. Desta forma, a possibilidade da colaboração para a composição de um elemento maior e mais nobre impulsiona e norteia as ações que culminaram neste momento.

Sou grato a Juliana Cardoso, por sua companhia sempre inspiradora, por sua leveza, sua verdade, sua ética, seu companheirismo e sua bondade.

Sou grato ao Lacqsa por confiar em mim os elementos que subsidiam este trabalho e sem os quais sua realização não seria possível, em especial a Eugênia pelo apoio e voto de confiança. Á equipe do laboratório e aos por lá passaram, em especial a Kátia, Eliene, Marcus, Ana, Gabriel, Sinvaldo e os Brothers, pela motivação, compreensão e ensinamentos que excedem o âmbito profissional.

Devo minha formação ao CEFET-MG e ao Departamento de Química, com merecida nota a professora Janice Cardoso, inspiração dentro da instituição. Agradeço a Marina Morieira e os colegas do registro, sempre atentos minha a evolução.

Ao meu professor orientador Claudinei Calado todo o meu apreço e admiração, pelo profissionalismo e acolhida. Obrigado por acreditar em mim e depositar confiança no meu trabalho.

Muito obrigado a todos, não seria possível sem vocês.

LISTA DE ABREVIATURAS

AACC - American Association for Clinical Chemistry

AFB1 - Aflatoxina B₁

AFB2 - Aflatoxina B₂

AFG1 - Aflatoxina G₁

AFG2 - Aflatoxina G₂

AFM1 - Aflatoxina M₁

AFT - Aflatoxina total

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

CAC - Codex Alimentarius Commission

CAST - Council for Agricultural Science and Technology

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CGAL - Coordenação Geral de Apoio Laboratorial

Cgcre - Coordenação Geral de Acreditação

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CTV - Citreoviridina

DON - Desoxinivalenol

EC - European Commission

EPI - Equipamento de Proteção Individual

FAO - Food and Agriculture Organization

FAPAS - Food and Environment Research Agency

FB1 - Fumonisina B₁

FB2 - Fumonisina B₂

FSD - Food Safety Department

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

IARC - International Agency for Research on Cancer

IDA - Ingestão diária aceitável

IDP - Ingestão Diária Provável

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

JEFCA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

Lacqsa – Laboratório de controle de Qualidade e Segurança Alimentar

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário

LMT - Limite máximo tolerado

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MERCOSUL – Mercado Comum do Sul

MR – Material de Referencia

MRC - Material de Referência Certificado

OIE - World Organisation for Animal Health

OIE - World Organization for Animal Health

OMC – Organização Mundial do Comércio

OTA – Ocratoxina A

Rt – Tempo de retenção

SDA - Secretaria de Defesa Agropecuária

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

WHO - World Health Organization

WTO - World Trade Organization

ZON – Zearalenona

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

Figura 1: Estrutura química das micotoxinas mais comuns. (I) Aflatoxina B1, (II) Aflatoxina B2, (III) Aflatoxina G1, (IV) Aflatoxina G2, (V) Aflatoxina M1, (VI) Ocratoxina A, (VII) Desoxinivalenol, (VIII) Zearalenona, (IX) Fumonisina B1, (X) Fumonisina B2, (XI) Citreoviridina.	15
Figura 2: Fatores que influenciam a presença de micotoxinas em alimentos.	25
Figura 3: Bomba recíproca utilizada em CLAE.....	31
Figura 4: Sistema de injeção de amostras em CLAE	32
Figura 5: Diagrama de um sistema cromatográfico típico.	34
Figura 6: Produção nacional de arroz entre 2001 e 2013.....	36
Figura 7: Resultados obtidos para as determinações de micotoxinas em alimentos realizadas pelo Lacqsa entre 1998 e 2013 em amostras fiscais de monitoramento.....	41
Figura 8: Contaminação de arroz por AFT	49
Figura 9: contaminação de arroz por OTA	49
Figura 10: Contaminação de arroz por ZON.....	50
Figura 11:Contaminação de arroz por DON	50
Figura 12: contaminação de arroz por CTV.....	51
Figura 13: Contaminação de arroz por AFT, OTA, ZON, DON e CTV em $\mu\text{g.kg}^{-1}$	51
Figura 14: AFT em arroz e suas frações	52

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Principais microorganismos produtores de micotoxinas e as condições ótimas para a produção deste metabólico secundário.	11
Tabela 2: Principais micotoxicoses humanas.....	16
Tabela 3: Classificação de compostos segundo potencial carcinogênico.	17
Tabela 4: Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas.....	20
Tabela 5: Fase móveis mais comuns.	30
Tabela 6: Número total de amostras analisadas para cada uma das matrizes.....	37
Tabela 7: Determinações realizadas entre 1998 e 2013 em matrizes animais e vegetais para AFT, AFM1, OTA, FB, DON, ZON e CTV.....	38
Tabela 8: Resultados obtidos para as determinações de micotoxinas em alimentos realizadas pelo Lacqsa entre 1998 e 2013 em amostras fiscais de monitoramento.....	41
Tabela 9: Co-ocorrência de AFT, OTA, FB, ZON e DON observada em amostras de milho, arroz e feijão analisadas pelo Lacqsa.....	42
Tabela 10: Número de amostras analisadas e amostras violadas conforme determinações realizadas pelo Lacqsa entre 1998 e 2013, ao se considerar as contaminações por AFT, AFM1, OTA, FB, DON e ZON e a Resolução Nº 07, de 9 de março de 2011	43
Tabela 11: Número de amostras analisadas e amostras violadas conforme determinações realizadas pelo Lacqsa entre 1998 e 2013, ao se considerar as contaminações pelas toxinas AFT, AFM1, OTA, FB, DON e ZON individualmente e a Resolução Nº 07, de 9 de março de 2011.....	45
Tabela 12: Violação de amostras de arroz, milho e trigo, decorrente da contaminação por AFT, OTA, FB, ZON e DON.	48

RESUMO

OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL ENTRE 1998 E 2013

PINTO, L.; CALADO, R.C.; VARGAS, E.

As micotoxinas são metabólitos secundários de origem fúngica, formados naturalmente em alimentos de origem vegetal e animal durante sua cadeia produtiva e de elevada toxicidade. Este trabalho tem por finalidade estudar a ocorrência e co-ocorrência de aflatoxinas BG (B1, B2, G1 e G2) (AFT), aflatoxina M1 (AFM1), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisina (B1 e B2) (FB), zearalenona (ZON) e citreoviridina (CTV) em alimentos comercializados no Brasil entre 1998 e 2013, assim como a taxa de produtos impróprios para o consumo devido a presença destes contaminantes naturais. Para isso, foram considerados os resultados obtidos pelo Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (Lacqsa) durante este período, em análises fiscais e de monitoramento executadas em cerca de 8500 amostras de origem vegetal e animal contemplando as categorias de frutas secas, castanhas, leguminosas, cereais, produtos a base de cereais, café, ração, insumos para ração, tecido animal e leite sob a ótica dos Limites Máximos Tolerados (LMTs) estabelecidos pela Resolução Nº 07, de 9 de março de 2011, da Agência Nacional de vigilância Sanitária (Anvisa). As determinações foram realizadas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), métodos analíticos. Foi constatado que 22% das amostras testadas para AFT estavam contaminadas, já para AFM1 a taxa de contaminação foi de 36%, para OTA 98%, para ZON 23%, para DON 27%, enquanto para CTV foi de aproximadamente 11%, além da co-ocorrência entre toxinas, que foi observada em amostras de milho, trigo, arroz e feijão.

Palavras-chave: micotoxinas, ocorrência, alimentos, exposição.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS	4
LISTA DE TABELAS E QUADROS	5
RESUMO	6
SUMÁRIO.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1. Micotoxinas.....	10
2.1.1. Definição	10
2.1.2. Impacto econômico.....	11
2.1.3. Estrutura química	13
2.1.4. Toxicidade	15
2.1.4.1. Aflatoxinas	17
2.1.4.2. Ocratoxina	18
2.1.4.3. Citreoviridina.....	19
2.1.4.4. Zearalenona	19
2.1.4.5. Fumonisina.....	19
2.1.5. Legislação e limites estabelecidos	19
2.1.6. Micotoxinas mascaradas	23
2.1.7. Produção de micotoxinas em alimentos	24
2.2. Análise de micotoxinas em alimentos	27
2.2.1. Métodos de análise	27
2.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	28
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.3.1. Qualidade analítica	35
2.3.2. Soluções padrão	35
2.3.3. Determinação de micotoxinas	36
2.4. Arroz.....	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4. CONCLUSÃO	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários de origem fúngica, formados naturalmente em alimentos de origem vegetal durante toda sua cadeia produtiva, do plantio a prateleira, podendo ainda estar presentes em produtos de origem animal em virtude da ingestão destes compostos por rebanhos alimentados com ração contaminada. Atenção tem sido dada às toxinas mascaradas, como são denominadas as derivações químicas das micotoxinas clássicas, frutos da decomposição destes contaminantes no ambiente, mas, sobretudo no meio biológico animal e vegetal, gerando espécies químicas de toxicidade variadas (BERTHILLER, 2012).

Apesar de sua presença acompanhar o homem desde o desenvolvimento da agricultura, apenas nas últimas décadas estes contaminantes tem recebido atenção das comunidades científicas e sanitárias (FAO, 2001), impulsionadas por pesquisas realizadas entre 1960 e 1970, quando foi atribuído a alguns metabólitos fúngicos a responsabilidade por doença e mortes de animais, sendo o mais notório caso a morte de milhares de perus na Inglaterra em decorrência da ingestão de ração contaminada por aflatoxinas (FAO, 2001). Na década seguinte tornou-se claro que as micotoxinas têm sido a causa de uma vasta gama de patologias humanas.

Hoje sabe-se que as micotoxinas podem causar efeitos maléficos em humanos, animais e culturas vegetais, quando inaladas, ingeridas ou absorvidas. Algumas são classificadas pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) como carcinogênicas ou potencialmente carcinogênicas, merecendo destaque a aflatoxina B1, posicionada no grupo de maior alarde desta organização (IARC, 1997). As micotoxicoses, como são denominadas as patologias humanas e animais causadas pela exposição à micotoxinas tem ações danosas, resultando em malefícios à saúde e podendo levar à morte, além de perdas econômicas pela indisponibilidade de alimentos seguros para o consumo.

Diversos estudos estimam as perdas econômicas atribuídas à ocorrência de micotoxinas nas commodities alimentícias. E ao prejuízo material, significativo no âmbito da deterioração de alimentos e perda de safras e

danos ao comércio internacional, somam-se os efeitos deletérios à saúde do consumidor. Frente a estes riscos, e com o objetivo de facilitar o comércio global, o Codex Alimentarius vem estabelecendo normativas com caráter orientativo, indicando as micotoxinas a serem controladas assim como os Limites Máximos Toleráveis (LMT) recomendados. A presença de micotoxinas em alimentos principalmente em amendoim, castanhas, milho, frutas secas, cereais, café e especiarias já é regulamentada por 99 países (FAO, 2004), incluindo o Brasil.

No âmbito nacional, a Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC Nº 7, publicada em 9 de março de 2011, aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados para as aflatoxinas BG (AFT) e M1 (AFM1), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas B1+B2 (FB), zearalenona (ZON) e patulina em alimentos prontos para o consumo e para processamento futuro, o que determina para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) a necessidade de atendimento à legislação em vigor, além de que, como grande produtor e exportador de commodities agrícolas sujeitas a contaminação por micotoxinas, o Brasil precisa atender aos limites máximos tolerados (LMT) estabelecidos pelos diversos países importadores em transações comerciais, como as legislações da União Européia dentre outras (EU1881/2006, EU165/2010, EU1058/2012 e EU212/2014).

Em observação ao risco que representa a contaminação por micotoxinas à esfera econômica e sanitária, este estudo tem o objetivo de avaliar, de forma ampla e extensa, o nível de contaminação de alimentos de grande representatividade na dieta e no comércio transfronteiriço nacional, com base nos resultados obtidos pelas análises de alimentos entre 1998 e 2013, obtidos pelo Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (Lacqsa).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Micotoxinas

2.1.1. Definição

Conforme definição de Pitt (1996), micotoxinas são metabólitos fúngicos que quando ingeridos, inalados ou absorvidos pela pele causam patologias e podem levar a morte humanos e animais.

É conhecido que as micotoxicoses, as doenças causadas por micotoxinas, tem sido causadoras de desastres epidemiológicos ao longo da história humana. Acredita-se que sejam responsáveis pela grande mortandade de pessoas e animais ao longo do tempo, culminando em um grave e notório incidente na década de 1940, quando, na então União Soviética, milhares de cavalos foram mortos pela ingestão de ração contaminada por micotoxinas e, posteriormente, na década de 1960, centenas de milhares de perus morreram na Inglaterra pelo mesmo motivo (PITT, 1996).

A contaminação humana por toxinas fúngicas, como as micotoxinas, apresenta quadros particulares, bem diferentes dos observados nas contaminações por toxinas bacterianas. A contaminação por toxinas bacterianas produz evidências imediatas, uma vez que são classicamente protéicas e reconhecidas pelo sistema imunológico. Este quadro diverge quando confrontado com a contaminação por micotoxinas, que são comumente compostos de baixo peso molecular e inócuos ao sistema imunológico, não produzindo assim sintomas evidentes e imediatos.

As micotoxinas são distribuídas em grandes categorias, estabelecidas em virtude de suas configurações químicas e origem microbiológica. Dentre elas, as principais são as aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, zearalenona e ocratoxina (CAST, 2003). As aflatoxinas são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e são agentes patológicos importantes (FAO, 2011).

Os tricotecenos compõem outra grande classe de toxinas e são produzidas por diversos gêneros de fungos, dentre os quais, as espécies de *Fusarium* merecem mais atenção por produzirem vasta variedade de micotoxinas (FAO/WHO/JEFCA, 2011). A toxina deste grupo que é encontrada mais

comumente em alimentos é a desoxinivalenol (DON), contaminante em grande extensão do trigo, da cevada e do milho (CAST, 2003).

Já as fumonisinas são produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides*, um patógeno quase onipresente em milho. Estas toxinas causam micotoxicoses graves em cavalos e porcos, em virtude da ingestão de ração a base de milho contaminada.

A zearalenona é produzida principalmente por *Fusarium graminearum* e tem comprovada co-ocorrência com DON em cereais (CAST, 2003). Enquanto as ocratoxinas são produtos de biossíntese do *Penicillium verrucosum* e podem causar significativas doenças veterinárias, principalmente em suínos.

Há ainda a classe de citreoviridina, um grupamento menor de micotoxinas produzida por varias espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, isoladas inicialmente a partir de culturas de fungos obtidos de arroz e associado com uma doença comum chamada beribéri (CAST, 2003). Porém, sua presença também é observada em outros cereais como, por exemplo, o milho. Entretanto, a presença dos fungos toxigênicos nos alimentos não resulta, necessariamente, em contaminação por micotoxinas, uma vez que sua produção está relacionada à condições ambientais predisponentes e como todos os metabólitos secundários, não são essenciais para o crescimento e sobrevivência do organismo. As condições ótimas para a produção de algumas micotoxinas por fungos estão apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Principais microorganismos produtores de micotoxinas e as condições ótimas para a produção deste metabólico secundário.

Microorganismo	Micotoxina	Temperatura (C°)	Atividade de água
<i>Aspergillus flavus</i>	AFBG	33	0,99
<i>Aspergillus ochraceus</i>	OTA	30	0,98
<i>Aspergillus carbonarius</i>	OTA	15 a 20	0,85 a 0,90
<i>Fusarium verticillioides</i>	FB	10 a 30	0,93
<i>Fusarium verticillioides</i>	DON	25 a 30	0,98
<i>Fusarium graminearum</i>	ZON	0 a 25	0,95

Fonte: PATRICIA, 2006

2.1.2. Impacto econômico

A estimativa do custo econômico da contaminação de alimentos por micotoxinas é complexa e extensa, uma vez que se faz necessária a contabilização de prejuízos advindos de diversos aspectos ligados a cadeia produtiva de alimentos. O cálculo deve abranger não apenas o prejuízo diretamente ligado à perda de produtos, como também à implantação de toda a cadeia de controle da contaminação (CAST, 2003). As implicações não são imediatamente perceptíveis na maioria dos casos, já que estão pulverizadas em diversos níveis, tais como as perdas de rendimentos na produção de lavouras alimentícias, uma vez que a presença das colônias fúngicas desvia recursos nutritivos e retarda seu desenvolvimento (SCUSSEL, 2008).

Deve-se considerar ainda a restrição à comercialização de produtos com níveis de contaminação que excedem os limites determinados por legislações, o que obriga produtores a destinar alimentos à mercados menos restritivos, e possivelmente menos rentáveis.

Para a obtenção de produtos de elevada qualidade e menor propensão à contaminação por micotoxinas, os produtores, invariavelmente, elevam seu custo de produção uma vez que fez necessário um combate à pragas mais severo, assim como o manejo da lavoura deve ser mais cuidadoso para geração de plantas saudáveis (FAO, 2001). Os custos pós-colheita também são mais elevados, com o uso de armazéns e silos com condições ambientais mais controladas e procedimentos de processamento mais controlados (SCUSSEL, 2008). Além disso, a estocagem de grãos se torna arriscada, demandando recursos elevados para a manutenção do produto em boa qualidade. A utilização do estoque de produtos como lastro financeiro, prática importante no agronegócio, tem alto custo e risco (SCUSSEL, 2008).

Há ainda o custo do processamento, uma vez que alimentos com contaminação identificada podem ser tratados e destinados a empregos com menor restrição de contaminação, o que encarece sua produção (BRASIL, 2011).

Outro elemento de análise complexa, é a perda de produtividade causada a rebanhos supridos por ração contaminada, já que seu desenvolvimento é notoriamente comprometido (SCUSSEL, 2008).

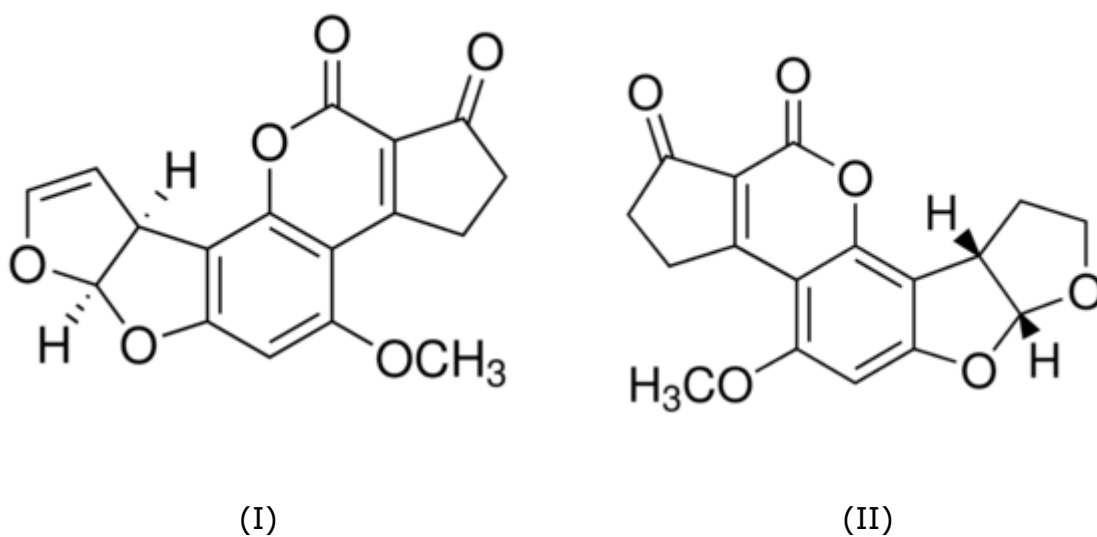
Estima-se que, por exemplo, as perdas anuais do mercado de produtos alimentícios industrializados e de gado nos Estados Unidos, em virtude desta série de contaminantes, chegue a 5 bilhões de dólares, em dados do FAO de 2001 (FAO, 2001).

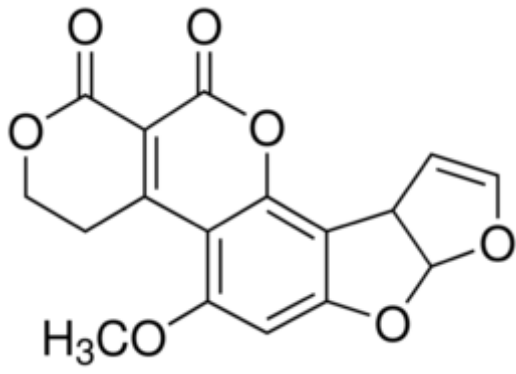
2.1.3. Estrutura química

As micotoxinas são compostos químicos de diversas classes orgânicas, apresentando baixas massas molares quando comparadas com outras toxinas, fruto do metabolismo microbiológico.

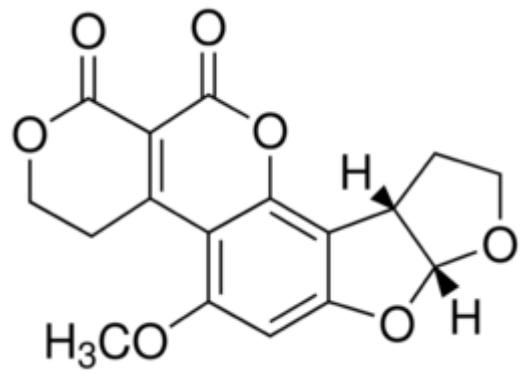
As estruturas química são termoresistentes, porem fotossensíveis, dificultando o processo de sua determinação em matrizes alimentares. Os vários tipos de processamento de alimentos aos quais são submetidos os compostos possivelmente contaminados não são capazes de tornar seguros alimentos com alto nível de contaminação.

As principais toxinas têm suas estruturas apresentadas a seguir, Figura 1:

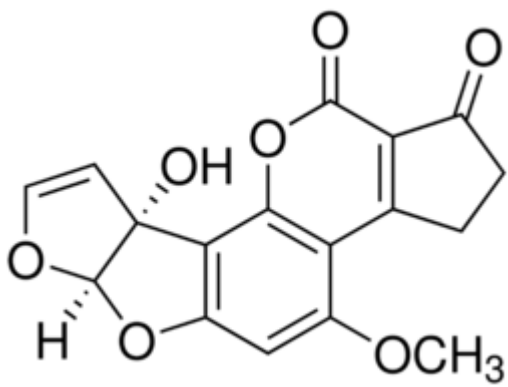




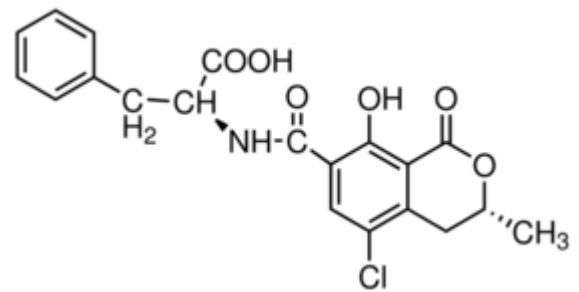
(III)



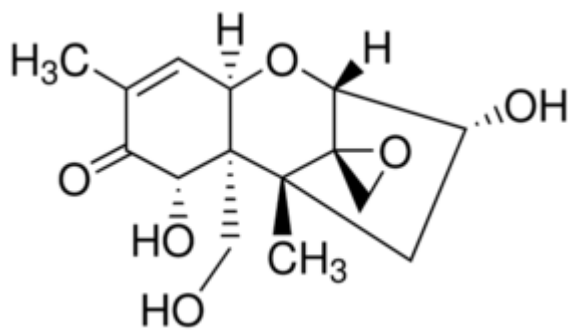
(IV)



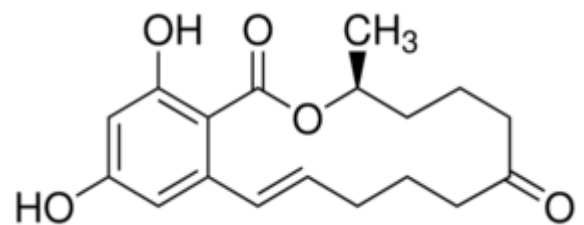
(V)



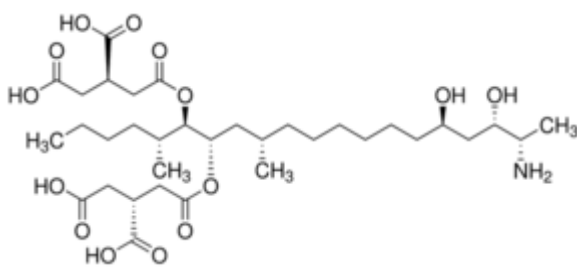
(VI)



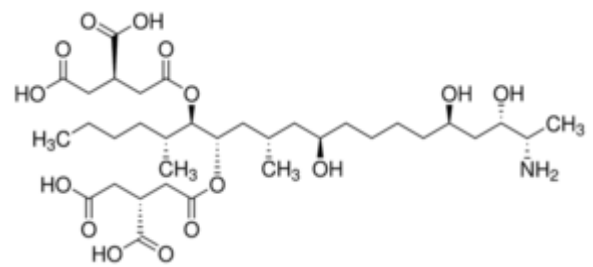
(VII)



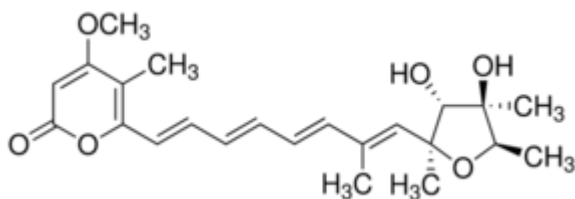
(VIII)



(IX)



(X)



(XI)

Figura 1: Estrutura química das micotoxinas mais comuns. (I) Aflatoxina B1, (II) Aflatoxina B2, (III) Aflatoxina G1, (IV) Aflatoxina G2, (V) Aflatoxina M1, (VI) Ocratoxina A, (VII) Desoxinivalenol, (VIII) Zearalenona, (IX) Fumonisina B1, (X) Fumonisina B2, (XI) Citreoviridina.

2.1.4. Toxicidade

Doenças causadas pela ingestão de micotoxinas acompanham o homem desde o desenvolvimento da agricultura. Durante a antiguidade, no período medieval, a Europa foi assolada por uma epidemia de ergotismo que causou a morte de milhares de pessoas, em um evento que ficou conhecido como Febre de St. Antony ou *Ignis Sacer* (WHO, 1999). Mais tarde, foi esclarecido que o mal era causado pelo consumo de centeio contaminado por *Claviceps purpúrea*, fungo produtor de toxinas alcalóides neurotóxicas (CAST, 2003).

O estudo de micotoxicoses então passou, por muito tempo, restrito a pesquisas agrícolas e veterinárias, sem chamar muita atenção da comunidade médica, porém este quadro tem mudado.

Já são elencadas diversas doenças causadas pela exposição humana a micotoxinas. A contaminação ocorre, majoritariamente, pela ingestão em alimentos, porém, também a inalação e absorção dérmica são vias relevantes de contágio (WHO, 1999).

As micotoxicoses podem se manifestar de forma aguda ou crônica, causando tumores ou ainda agindo na fragilização do sistema imunológico humano. Desta forma, a atuação nociva destas toxinas pode ser mascarada pela ação agressiva de doenças infecciosas oportunistas (WHO, 1999).

A produção de toxinas por fungos encontra emprego tecnológico e medicinal importante, como na produção de medicamentos, mas suas aplicações devem ser muito bem avaliadas. Vê-se o caso da citrinina, que já foi largamente utilizada como antibiótico, mas atualmente tem seu uso

proibido em virtude da alta toxicidade que apresenta ao ser humano (CAST, 2003).

A presença de micotoxicoses não obedece a barreiras econômicas, sociais e fronteiriças, tornando potencialmente perigosas suas epidemias. Isto se dá em virtude do comércio globalizado de *commodities* alimentícias, que desencadeia o transporte de alimentos contaminados de continentes produtores para consumidores, expondo o produto a condições ambientais e sanitárias diversas. Este cenário, aliado a grande gama de fungos filamentosos toxigênicos, torna a presença de micotoxinas em alimentos virtualmente inevitável, justificando investimentos em pesquisa e desenvolvimento de técnicas agrícolas e comerciais sanitariamente seguras. As principais micotoxicoses humanas são apresentadas na tabela 2:

Tabela 2: Principais micotoxicoses humanas

Micotoxicose	Espécie	Alimento	Agente etiológico
Akakabio-byo	Humano,	Trigo, cevada, aveia, arroz	<i>Fusarium spp.</i>
Alimentar aleukia tóxicos	Humano,	Cereais	<i>Fusarium spp.</i>
Nefropatia dos balcãs	Humano,	Cereais	<i>Penicillium</i>
Beribéri cardíaca	Humano,	Arroz	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i>
Dendrodochiotoxicosis	Humano,	Forragem	<i>Dendrodochiumtoxicum</i>
Ergotismo	Humano,	Centeio, cereais	<i>Clavicepspurpurea</i>
Tumores de esôfago	Humano,	Milho	<i>Fusariummoniliforme</i>
Hepatocarcinoma (aflatoxicose aguda)	Humano,	Cereais, amendoim	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>
Doença kashin Beck "doença urov"	Humano,	Cereais	<i>Fusarium</i>
Kwashiorkor	Humano,	Cereais	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>
Síndrome de Reye	Humano,	Grãos de cereais	<i>Aspergillus</i>
Stachybotryotoxicosis	Humano,	Cereais, forragens	<i>Stachybotrysatra</i>

Adaptado de CAST (2003)

2.1.4.1. Aflatoxinas

As principais espécies fúngicas produtoras de aflatoxinas são *Aspergillus flavus*, produtor de aflatoxina B1 e *Aspergillus parasiticus*, que produz aflatoxina B1 e G1. A aflatoxina M1 é produto da biotransformação oxidativa da toxina tipo B1, que ocorre no meio biológico animal e é excretado no leite, fezes e urina (WHO, 1999). As toxinas AFB2 e AFG2 são produtos da transformação de AFB1 e AFG1, respectivamente.

As aflatoxinas são compostos imunossupressores e, conforme relatório expedido pela *International Agency for Research on Câncer* (IARC) (IARC, 1997), a agência especializada na pesquisa sobre o câncer da Organização Mundial da Saúde, no documento em que também afirma haver provas suficientes para assegurar a carcinogenicidade das aflatoxinas, sendo enquadradas no Grupo 1. A exceção da toxina Aflatoxina M₁, que ocupa o Grupo 2B, atacando principalmente o fígado (IARC, 1997).

A classificação realizada pelo IARC dos compostos quanto a seu potencial carcinogênico é realizada após análise de informações mundialmente disponível na comunidade científica, por comitês reunidos com esta finalidade (IARC, 2006). A atual definição dos agrupamentos é apresentada na tabela 3.

Tabela 3: Classificação de compostos segundo potencial carcinogênico.

Grupo	Definição
1	"Cancerígeno para os seres humanos" Há evidências suficientes para concluir que estes compostos podem causar câncer em humanos.
2A	"Provavelmente cancerígeno para os seres humanos" Há fortes indícios de que estes compostos podem causar câncer em humanos, mas, atualmente, não é conclusivo.
2B	"Possivelmente carcinogênico para humanos" Há alguma evidência de que estes compostos podem causar câncer em humanos, mas neste momento está longe de ser conclusivo.

Tabela 3: Classificação de compostos segundo potencial carcinogênico. Continuação.

3	"Inclassificáveis quanto à carcinogenicidade em seres humanos" Não há nenhuma evidência neste momento de estes compostos podem causar câncer em seres humanos.
4	"Provavelmente não carcinogênico para humanos" Há fortes indícios de que estes compostos não podem causar câncer em humanos.

Fonte: IARC (2006)

Doenças agudas ocasionadas pela ingestão uma de aflatoxinas se manifestam, sobretudo no fígado (CAST, 2003). As manifestações típicas incluem icterícia, febre branda e diarreia. Duas doenças humanas de etimologia ainda indefinida foram ligadas a ingestão de micotoxinas (CAST, 2003), as síndromes de Kwashiorkor e de Reye.

2.1.4.2. Ocratoxina

A ocratoxina A é produzida principalmente por *Aspergillus verrucosum ochraceus* e *Penicillium* e ocorre em alimentos de grande consumo, como cevada e café. A toxina é comprovadamente nefrotóxica e hepatotóxica (CAST, 2003).

Um fato importante na avaliação do perigo desta toxina ocorreu em 1956, quando foi notificado o primeiro caso onde um homem foi acometido por uma doença de depressão renal até então desconhecida, e agora nominada Nefropatia dos Balkans (CAST, 2003). Como o paciente tinha sua dieta contaminada por ocratoxina A e já era conhecida a periculosidade desta toxina para o sistema renal, o composto foi apontado como principal suspeito de causar a doença. Aliou-se a esta evidência a co-ocorrência de tumores renais em paciente que apresentavam a nefropatia, reforçando a idéia de que a ocratoxina A é a responsável pelo mal.

2.1.4.3. Citreoviridina

A principal micotoxicose causada pelo consumo de alimentos contaminados por citreoviridina é o beribéri. A patologia que atinge largamente países asiáticos tinha sua causa associada à carência de vitaminas, mas que já tem sua ocorrência comprovadamente associada à intoxicação por citreoviridina (WHO, 1999).

A doença é caracterizada por palpitações, náuseas, vômitos, dificuldade respiratória, pulso rápido, arritmia cardíaca, baixa pressão arterial, podendo levar à morte (WHO, 1999).

2.1.4.4. Zearalenona

Não há, ainda, informações que subsidiem conclusões acerca da ação da zearalenona em pacientes humanos. Porém, investiga-se o curioso e alarmante caso de aceleração do crescimento e amadurecimento precoce de meninas na faixa de 7 a 8 anos, em Porto Rico (WHO, 1997). As crianças tiveram contato com a toxina pela dieta, ao ingerirem carne de boi contaminada. A possível causa da exposição é a utilização de um derivado da toxina como elemento anabólico na pecuária.

Já é sabida a capacidade da toxina de se ligar ao miométrio humano (CAST, 2003) e a ação nociva sobre o sistema endócrino, possivelmente os elementos causadores das perturbações sofridas pelas jovens pacientes porto-riquenhas.

2.1.4.5. Fumonisina

A fumonisina que contamina principalmente milho colonizado por fungos filamentosos é um importante agente carcinogênico, acatando principalmente o fígado e o esôfago (IARC, 2011).

A toxina é ainda agressiva ao sistema hepático e renal (CAST, 2003).

2.1.5. Legislação e limites estabelecidos

A periculosidade de micotoxinas tem levado governos a limitar a concentração máxima destes contaminantes em alimentos, em uma tentativa de oferecer aos cidadãos uma dieta mais segura.

Chama-se atenção, porém, a diferença nos níveis aceitáveis em diversas regulamentações pelo mundo. A grande divergência entre os limites tolerados para as diversas toxinas levanta suspeitas de que a aplicação

desta barreira sanitária possa estar sendo utilizada como um entrave ao livre comércio entre as nações.

O cenário ideal é aquele onde apenas fatores científicos e sanitários embasem a tomada de limites, e que estes sejam os mais restritos possível, porém, vive-se uma condição onde elementos políticos e econômicos permeiam estas decisões, evidenciado pela tentativa de harmonização de normativas que regulam o comércio de nações comercialmente próximas a exemplo do que ocorre com Austrália e Nova Zelândia, União Européia e MERCOSUL (FERNANDES, 2007).

Os fatores sócio-políticos e econômicos têm um impacto muito grande, já que o atendimento aos interesses comerciais nacionais e internacionais, além da primordial necessidade de fornecimento de alimentos aos cidadãos, devem ser considerados, para evitar o ruptura do sistema agropecuária e o desabastecimento de alimentos.

A fim de se impedir a subjetividade que possa aparentemente governar a adoção destes valores, e frente a impossibilidade atual de se erradicar completamente as micotoxinas dos alimentos, órgãos regulamentadores se valem de ensaios toxicológicos e mapas de ocorrência em seus estudos.

A evolução nos níveis aceitáveis de contaminação é progressiva e constante, em que cada vez mais toxinas e matrizes são abarcadas e normativas diminuem os teores permitidos. Isto se intensifica a medida que é aumentada a sensibilidade de métodos de análise e a toxicidade de toxinas aos homens é desanuviada.

O Brasil conta com a Resolução RDC N° 07, de 9 de março de 2011, emitido pela Anvisa, que estabelece os Limites Máximos Tolerados para diversas micotoxinas em várias matrizes alimentícias, prevendo ainda o acirramento de níveis tolerados para o futuro próximo. Na Tabela 4 são apresentados os valores estabelecidos na normativa.

Tabela 4: Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Aplicado desde fevereiro de 2011, data de publicação da Resolução RDC N° 07		
Aflatoxina M1	Leite fluido	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5

**Tabela 4: Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas –
Continuação**

	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gengibre) Curcuma longa (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20
	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
	Feijão	10
	Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10
	Vinho e seus derivados, suco de uva e polpa de uva	2
Ocratoxina A	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gengibre) Curcuma longa (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20
	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
Ocratoxina A	Feijão	10
	Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10
	Vinho e seus derivados, suco de uva e polpa de uva	2

**Tabela 4: Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas –
Continuação**

Ocratoxina A	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gengibre) Curcuma longa (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	30
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	2
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Amêndoa de cacau	10
	Frutas secas e desidratadas	10
Desoxinivale nol (DON)	Arroz beneficiado e derivados	750
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Fumonisinias (B1 + B2)	Milho de pipoca	2000
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Zearalenona	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	20
Patulina	Suco de maçã e polpa de maçã	50
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	2000
Aplicado desde janeiro de 2012		
Desoxinivale nol (DON)	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	1750
Fumonisinias (B1 + B2)	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	2500
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	2000
	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	200
	Arroz beneficiado e derivados	200
Zearalenona	Arroz integral	800
	Farelo de arroz	1000
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	300
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	400
Aplicado desde janeiro de 2014		
Ocratoxina A	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	20
	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000
Desoxinivale nol (DON)	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1500
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	1250
Fumonisinias (B1 + B2)	Milho em grão para posterior processamento	5000
Zearalenona	Milho em grão e trigo para posterior processamento	400

**Tabela 4: Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas –
Continuação**

Aplicado a partir janeiro de 2016		
Desoxinivalenol (DON)	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	750
Fumonisinias (B1 + B2)	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
	Amido de milho e outros produtos a base de milho	1000
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	100
	Arroz beneficiado e derivados	100
	Arroz integral	400
	Farelo de arroz	600
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e sub-produtos à base de milho	150
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	200

Adaptado de Brasil (2011)

2.1.6. Micotoxinas mascaradas

Organismos animais e vegetais expostos a micotoxinas podem usar de artifícios para combater esta intoxicação, e uma destas armas é a conversão da estrutura química do contaminante. As toxinas resultantes desta derivação que apresentem comportamento químico e analítico diferentes de suas toxinas progenitoras são chamadas micotoxinas mascaradas, uma vez que não respondem de maneira semelhante aos métodos de determinação aplicados às toxinas de origem (SARAH, 2012).

As toxinas mascaradas podem ainda ser produzidas naturalmente, pela exposição das micotoxinas a condições ambientais apropriadas ou durante o processamento do alimento.

Por definição, a presença de toxinas mascaradas implica na subestimação da toxicidade de alimentos, já que compostos nocivos são desconsiderados na estimativa de risco dos produtos. Por outro lado, as transformações sofridas pelas toxinas que gerem compostos de toxicidade diminuída devem, prioritariamente, ser classificadas como desintoxicação (BERTHILLER, 2012) e a detecção de substâncias comprovadamente atóxicas não despertam muito interesse no âmbito da segurança alimentar. Desta forma, a classificação dos produtos de variação química a que são

submetidas às micotoxinas somente podem ser realizada, entre mascaradas ou desintoxicadas, após a completa elucidação do comportamento analítico e toxicológico destes compostos.

Não há, até o momento, pesquisas que apontem os principais compostos de degradação das micotoxinas e suas classificações como mascaradas ou não (BERTHILLER, 2012).

2.1.7. Produção de micotoxinas em alimentos

A contaminação fúngica de alimentos, assim como a produção destes metabolitos secundários pelos microrganismos é uma função complexa que combina influências de técnicas plantio, de manuseio, estocagem, assim como de condições climáticas (FAO, 2001).

A proliferação de fungos filamentosos sobre as plantações e produtos alimentícios é potencialmente perigosa. Sua colonização durante a produção da lavoura é dependente de elementos como a bio-disponibilidade de cepas dos microrganismos e de adequações climáticas (PATERSON, 2010). A presença de água livre e disponível, assim como a adequação da temperatura são fatores que condicionam a colonização dos fungos capazes de produzir as toxinas em detrimento daqueles microorganismos que inocuamente colonizam a superfície do alimento (CAST, 2003). Durante o armazenamento dos grãos, os fatores principais são a temperatura, as concentrações de cepas, o dano mecânico sofrido pelo alimento e a infestação de insetos e pragas (CAST, 2003). Portanto, afirma-se que a contaminação por micotoxinas é um processo aditivo, representado pelo somatório da produção de toxinas no pré e pós colheita (CAST, 2003).

Os fungos responsáveis pela contaminação podem ser divididos em duas categorias, os fungos de armazenamento e de plantio. Os fungos que contaminam o alimento durante o armazenamento são aqueles capazes de se desenvolver em condições de umidade entre 70 e 90%, sem a presença reduzida de água livre (CAST, 2003), enquanto os fungos que contaminam durante a colheita têm maior necessidade por água. Esta classificação não ignora a existência de espécies capazes de colonizar o alimento sob as duas condições.

As condições ambientais são também extremamente importantes, principalmente na etapa de pré-colheita, como apresentado na figura 3. O fortalecimento da planta e favorecimento de fungos não toxigenicos varia com abundância de chuvas. A presença de aflatoxinas, por exemplo, é maior em anos de temperatura acima da média e poucas chuvas.

Durante a armazenagem dos grãos, os fatores fundamentais são: a atividade de água, a aeração do produto, a presença de cepas, os danos mecânicos sofridos pelo alimento e a presença de insetos (PATERSON, 2010).

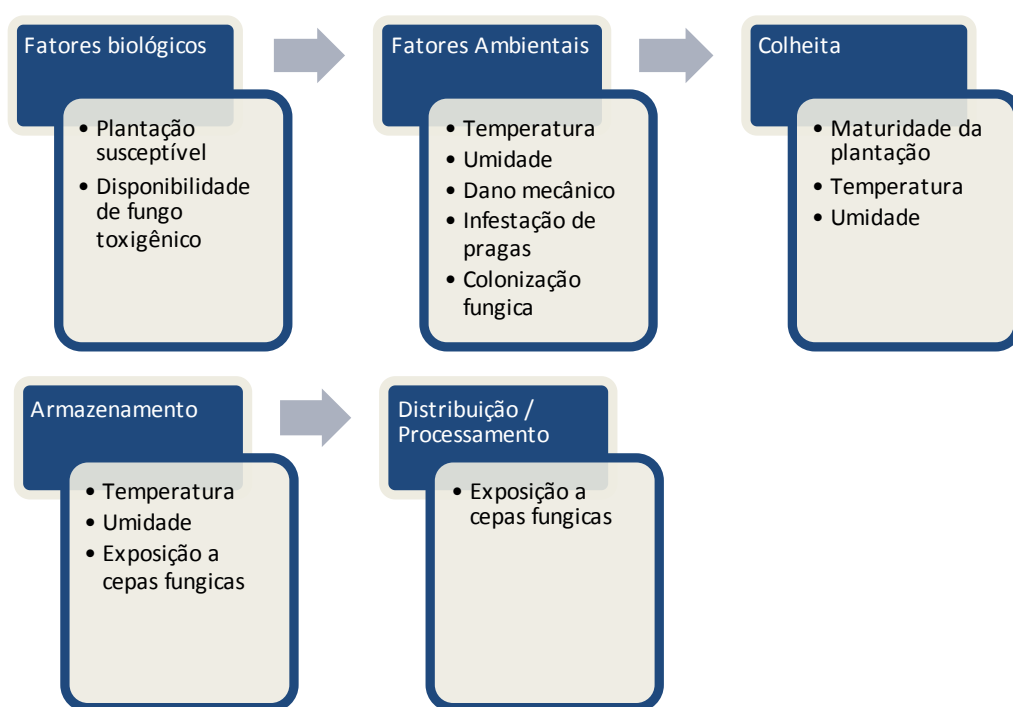


Figura 2: Fatores que influenciam a presença de micotoxinas em alimentos.

Faz-se importante a utilização de práticas de gestão elaboradas no sentido de reduzir o estresse sofrido pela planta e pelo produto, a fim de minimizar a contaminação. Recomenda-se utilizar, sempre que possível, o cultivo de variedades resistentes a infestação de fungos toxigênicos, empregar fertilização e irrigação adequadas, além de manter um eficiente controle de pragas, insetos e ervas daninhas.

Uma vez que a produção de micotoxinas em alimentos é um fenômeno complexo e dependente de inúmeros fatores, a síntese dos contaminantes é pontual, caracterizando sua presença de maneira heterogênea. Os níveis

observados em grãos, por exemplo, mesmo frutos da mesma planta, podem apresentar grande discrepância, o que torna possível a segregação de elementos intensamente infectados por fungos uma prática válida na diminuição da contaminação de lotes de alimentos (CAST, 2003).

Há atualmente uma grande aposta no desenvolvimento de lavouras constituídas por variedades vegetais geneticamente modificadas, que apresentem maior resistência ao ataque de fungos toxigênicos e a acumulação de micotoxinas, mas até então, não há ainda sementes comercialmente disponíveis. Há ainda, em virtude da inviabilidade do controle químico destas toxinas naturais, o investimento no desenvolvimento de agentes biológicos para a proteção das lavouras, ganhando destaque a utilização de fungos inócuos às plantas e ao homem que ocupem o mesmo nicho ecológico que os fungos filamentosos produtores das toxinas, lhes oferecendo competição e assim reduzindo a amplitude da contaminação por micotoxinas (CAST, 2003).

Durante o pós-colheita, os esforços para o controle da presença de micotoxinas se baseiam em técnicas que evitem a adição de contaminantes aos produtos, assim como na sua descontaminação. As ações neste sentido são categorizadas entre meios físicos de separação, meios físicos de descontaminação, meios biológicos de descontaminação e meios químicos de descontaminação (CAST, 2003). Os meios físicos de separação são aqueles em que elementos de elevada contaminação aparente são separados e eliminados. Além da catação, a separação por densidade apresenta bom resultado, apesar de muitas vezes ser impraticável e incompleta.

Os métodos físicos de descontaminação tem aplicabilidade e aproveitamento bem variados (CAST, 2003). A inativação térmica das toxinas tem sido utilizada, porém esbarra na grande estabilidade térmica de algumas toxinas. A irradiação por raios gama, tanto microondas quanto luz ultravioleta também tem sido empregada experimentalmente, apresentando resultados animadores (CAST, 2003). A extração por solvente é outra opção, mas ainda inviável pelo volume de solvente de extração demandado.

Na frente biológica, a utilização de algumas espécies de *Eubacterium* tem obtido sucesso na desativação de tricotecenos por bio-transformação, obtendo-se uma espécie menos tóxica.

Os métodos químicos de maior sucesso, até então, fundamentados na ação de adsorventes que capturam as toxinas, as indisponibilizando para a bio-assimilação, como alumino silicatos e carvão ativado. Os agentes sequestrantes se valem de propriedades físico-químicas em seus mecanismos de ação, entre eles a polaridade, o que condiciona eficiência relativa destes agentes sobre as diversas toxinas.

No sentido de fomentar praticas de pré e pós-colheita que minimizem o risco de contaminação, organismos internacionais de grande relevância e contribuição para a segurança alimentar apresentam documentos orientativos para a condução das práticas agrícolas e comerciais de alimentos, como os propostos pelo *Codex Committee on Food Additives and Contaminants* e FAO (*Manual on the application of the HACCP System in Mycotoxin prevention and control*).

2.2. Análise de micotoxinas em alimentos

2.2.1. Métodos de análise

Uma vasta gama de métodos tem sido desenvolvida para a análise de micotoxinas em alimentos. Em virtude na complexidade e diversidade das matrizes analisadas, os procedimentos analíticos são geralmente compostos por etapas de extração, *cleanup*, separação, detecção, quantificação e confirmação. Os métodos são fundamentados nas mais diversas facetas do comportamento químico das toxinas e apresentam desempenhos distintos no que tange a qualidade analítica e agilidade das análises. Portanto, a escolha dos protocolos de determinação é fundamental para o sucesso de processo investigativo (BRASIL, 2011).

Entre os métodos mais difundidos em laboratórios acreditados na norma ISO 17025 e participantes de programas de ensaio laboratorial como o FAPAS™, destacam-se a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Observam-se ainda o emprego de técnicas imunoensimáticas de detecção, além de kits comercialmente disponíveis para teste rápidos, utilizados de maneira

exploratória ou com finalidade de monitoramento por empresas e indústrias alimentícias (BRASIL, 2011).

O Lacqsa tem em seu escopo acreditado na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 pelo Inmetro, para análise de micotoxinas, métodos fundamentados em CCD e HPLC nas mais diversas matrizes, sob o número de acreditação CRL 0351. Submetendo seus procedimentos analíticos a ensaios de proficiência e estudos colaborativos internacionais, nos quais ontem alto desempenho.

2.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Como uma técnica de separação, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência faz uso de diferenças químicas e físicas dos componentes de uma mistura para separá-los (COLLINS at. al, 2006). Este importante método de separação encontra largo emprego na indústria química, farmacêutica e de controle de qualidade por ser capaz de separar compostos em misturas complexas e quimicamente heterogêneas.

Vários nomes são usados para denominar esta técnica, mas adota-se comumente a nomenclatura de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e seu análogo em inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

O processo de separação pode ser conduzido em instrumentos que apresentam alto grau de automatização, modernos e provenientes de diversos fabricantes mundiais. Os sistemas cromatográficos se encontram em constante avanço, tornando-se cada vez mais rápida e adaptável, qualidades indispensáveis a sua aplicação, tanto em rotina analítica como na pesquisa (SKOOG, 2009). Outra série de fatores importantes que norteiam o desenvolvimento da técnica são os que tangem a química verde, gradativamente orientando os equipamentos a utilização de insumos em menor quantidade e toxicidade, buscando o maior aproveitamento de consumíveis e insumos em suas análises (SKOOG, 2005).

Há seis diferentes mecanismos que governam as separações conduzidas na cromatografia líquida que podem ser exploradas conforme as particularidades da matriz e do analito, caracterizando a cromatografia de adsorção, cromatografia de partição, cromatografia quiral, cromatografia

por bioafinidade e a cromatografia por exclusão (SKOOG, 2009). Aqui trataremos apenas da cromatografia por adsorção, agrupamento no qual se enquadram as determinações de micotoxinas em alimentos cujos dados são objetos deste estudo.

O mecanismo de separação cromatográfica por adsorção fundamenta-se na competição entre espécies do analito e as espécies da fase móvel pela ocupação dos sítios ativos disponíveis na fase estacionária (COLLINS, 2006), de maneira semelhante ao que ocorre na já experimentada Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Para a adsorção da espécie química do analito, primeiro uma espécie da fase móvel deve ser deslocada da superfície do adsorvente. Se o adsorvente apresentar uma superfície polar, no caso sílica, grupos apolares terão por ela pouca afinidade e será mantida a espécie da fase móvel adsorvida, logo estes grupos serão pouco retidos (SKOOG, 2009). Já grupos apolares forçaram a remoção das espécies da fase móvel com grande intensidade, as substituído nos sítios ativos da fase estacionária, estes serão compostos muito retidos. Um caso particular é a eluição de moléculas polarizáveis, estas apresentaram interação dipolo-dipolo induzido com a superfície do adsorvente e também serão por ele retidas em grau que dependa da polarização das espécies ou grupos funcionais que apresentam (COLLINS, 2006).

A fase móvel ocupa um papel de destaque na condução das análises cromatográficas ao exercer duas funções chave no processo ao arrastar os componentes da amostra através do sistema e participar da separação.

Desta forma, a seleção da fase móvel é uma etapa extremamente relevante para o sucesso da separação e é fundamentada nas características físico-químicas dos solventes, os principais são enumerados abaixo:

- Obtido com alto grau de pureza.
- Dissolver a amostra de maneira inócua a seus componentes.
- Não decompor a fase estacionária.
- Apresentar baixa viscosidade.
- Compatibilidade com o sistema de detecção empregado.

A força de eluição da fase móvel é um parâmetro de sua capacidade em interagir com os componentes da amostra (COLLINS et. al, 2006), os arrastando pela fase estacionaria e deve ser ajustada com cuidado. Os principais solventes utilizados como fase móvel em cromatografia de adsorção são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Fase móveis mais comuns.

Composto	Formula Molecular
Acetonitrila	C ₂ H ₃ N
Água	H ₂ O
Metanol	CH ₄ O
Tetrahidrofurano	C ₄ H ₈ O
Triclorometano	CHCl ₃
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂
Éter etílico	C ₄ H ₁₀ O
Éter metil terc-butílico	C ₆ H ₁₄ O
Hexano	C ₆ H ₁₄

Fonte: COLLINS (2006)

Misturas desses solventes são geralmente observadas em métodos de análise cromatográficos (COLLINS, 2006).

Para a separação é utilizado a fase estacionária como recheio das colunas cromatográficas. São geralmente construídas em partículas de sílica ou alumina, quando em cromatografia por adsorção, usualmente com diâmetro médio entre 0,6 µm e 10 µm (SKOOG, 2009). As partículas são porosas, com grande área superficial. Alguns fabricantes já oferecem partículas com núcleo rígido e impermeável, como é o caso da linha Kinetex™ ofertada pela Phenomenex.

A sílica e sílica modificada são as fases estacionárias mais comuns, em virtude de suas características físicas favoráveis. As partículas podem ser preparadas em sílica em uma grande variedade de tamanho médio de poros (entre 7 e 100 nm), tamanho de partícula (entre 0,6 e 10 µm) (SKOOG, 2009), condicionáveis a forma esférica, irregular ou monolítica, favorecendo um preenchimento homogênea e compacto da coluna de separação. A sílica, como suporte, pode ser modificada e funcionalizada, conferindo seletividade e especificidade aos métodos que às empregam (COLLINS, 2006).

A fim de suportar as pressões de bombeamento de centenas de atmosferas, requeridas para a propulsão do eluente através de colunas super compactadas com a vazão necessária, os cromatógrafos são construídos

com grande robustez e são elaborados em módulos dedicados a cada etapa do processo analítico. Os módulos são cambiáveis e formam um equipamento ágil, adaptável a diversas necessidades da rotina e pesquisa.

A fase móvel, mantida em frascos protegidos da luz e isolados, são propelidos pelo sistema por bombas capazes de gerar pressões da ordem de 6000 psi (librasempolegada quadrada) ou cerca 420 kgf/cm² (quilograma força/centímetro quadrado) (SKOOG, 2009), em um fluxo livre de pulsos e vazões na faixa de 0,1 a 10 mL.min⁻¹. É fundamental ainda apresentar resistência a corrosão promovida por elementos da fase móvel de não expor elementos possíveis de serem lixiviados por esta. Para a propulsão da fase móvel são utilizados os sistemas de bombas de deslocamento, tipo seringa e recíprocas, como representada na figura 3, sendo este último o de uso mais difundido em equipamentos comerciais (COLLINS, 2006).

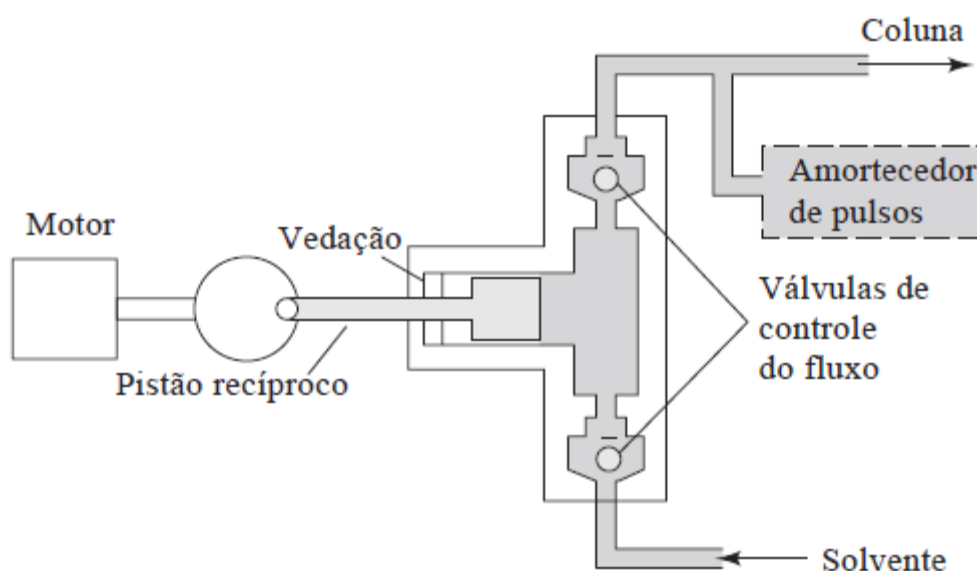


Figura 3: Bomba recíproca utilizada em CLAE

Fonte: SKOOG (2009)

Um grande limitante da reprodutibilidade nas determinações cromatográficas é a precisão com que são injetadas as amostras no sistema, aliada a saturação da coluna pela injeção em excesso de material (SKOOG, 2009). Outro fator importante é a possibilidade de co-contaminação (*carryover*) entre injeções, um problema em análises de rotina em grandes bateladas.

Um complicador do processo de injeção é o fato do sistema operar pressurizado, tornando difícil a introdução da amostra. Este cenário torna o sistema de injeção de amostras uma parte crítica na construção e operação do equipamento e vem recebendo ultimamente muita atenção dos fabricantes, uma representação do sistema de injeção pode ser visto na figura 4. O método mais comum para a injeção de amostra neste cenário faz uso de uma alça de amostragem (*loop*), tubulação cambiável com volume determinado instalado em paralelo a linha pressurizada do sistema (SKOOG, 2009). Os equipamentos podem vir dotados de módulos de injeção automática de amostras, o que colabora para a automatização de rotinas, economia de tempo do analista e ganho na reprodutibilidade dos resultados (SKOOG, 2006).

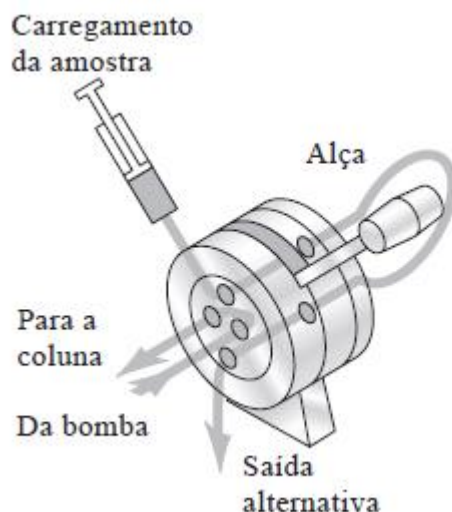


Figura 4: Sistema de injeção de amostras em CLAE

Fonte: SKOOG (2009)

As colunas analíticas são tubos de aço inoxidável que contem a fase estacionária em alto grau de compactação. São construídas usualmente com comprimento entre 50 a 250 mm e diâmetro interno de 3 a 5 mm. As colunas têm sua eficiência medida em número de pratos teóricos por comprimento e apresentam desempenho entre 40.000 e 100.000 pratos por metro (COLLINS, 2006).

Freqüentemente é utilizada uma coluna de guarda, ou pré-coluna, instalada na linha do equipamento em posição anterior ao da coluna analítica. Este dispositivo aumenta o tempo de vida útil da coluna analítica por remover não somente material particulado e impurezas que

por ventura entupiriam a coluna, mas também livrando o fluxo de espécies que podem se ligar irreversivelmente à fase estacionária contida na coluna de separação (COLLINS, 2006). A coluna de guarda não tem nenhuma pretensão de colaborar com a separação de compostos. As colunas analíticas são, portanto, uma parte fundamental e determinante no processo cromatográfico.

A detecção neste tipo de análise fica a cargo de uma série muito ampla de detectores. Esses são dispositivos analíticos recorrentes em laboratórios analíticos que foram adaptados à detecção de baixas concentrações e na sua evolução reside um dos grandes desafios ao aprimoramento da cromatografia líquida de alta eficiência (SKOOG, 2009).

Os detectores na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência são divididos em dois grupos. Os sensíveis às condições da fase móvel são conhecidos como Detectores de Propriedades Universais e estão entre eles os detectores de índice de refração, de constante elétrica e densidade. Já os Detectores de Propriedade do Sóluto respondem apenas às características do soluto ignorando condições do eluente (mas devem ser considerada a influência de todos os compostos que integram o fluxo de eluição sobre o comportamento do analito no sistema de detecção), como os detectores de ultravioleta-visível e detector de fluorescência, estes últimos empregados nas técnicas executadas para a obtenção dos dados apresentados neste trabalho (COLLINS, 2006). Há ainda a possibilidade de utilização de detectores de massa das mais diversas categorias.

Os detectores de ultravioleta-visível fundamentam sua operação na absorção de energia eletromagnética na faixa de comprimento de onda que compreende a região espectral do ultravioleta e visível.

Apesar da emissão se dar em comprimentos de onda específicos, a seletividade é baixa, uma vez que grande parte de compostos químicos apresentam absorção energética nesta faixa e seu emprego depende de uma eficiente segmentação da mistura na fase separação. A construção do detector é similar aos instrumentos de espectrofotometria que

equipam tradicionalmente grande parte dos laboratórios, recebendo adaptações para a detecção em baixas concentrações.

O sistema de detecção por fluorescência para CLAE, como a maioria dos fluorímetros e espectrofluorímetros tradicionais, observam a fluorescência do analito excitado por um transdutor fotoelétrico posicionado a 90° do feixe de excitação (SKOOG, 2009). Empregam, basicamente, uma fonte de excitação e filtros para isolar uma banda de emissão de radiação. Apesar da limitada aplicabilidade, uma vez que não são todas as espécies que florescem, ou que geram qualitativamente compostos fluorescentes por derivatização, o detector apresenta a vantagem de elevada detectabilidade e seletividade (USP, 2011). Uma visão holística do sistema de separação de um cromatógrafo é apresentada na figura 5:

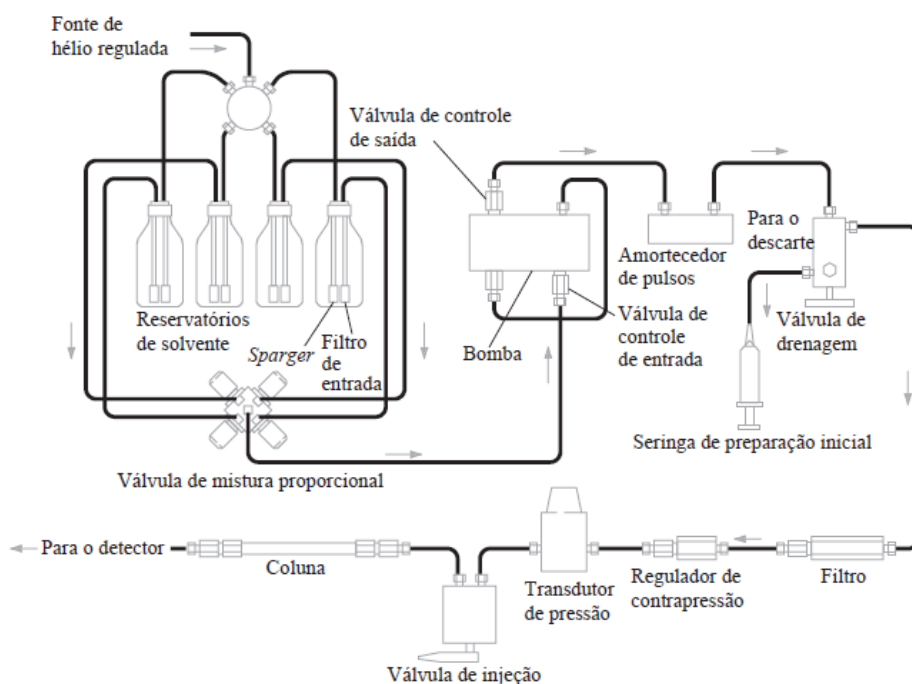


Figura 5: Diagrama de um sistema cromatográfico típico.

Fonte: SKOOG (2009)

Muito em virtude do alto desempenho e enorme aplicabilidade da espectrometria de massa, é cada vez mais forte a utilização de detectores de massas acoplados a sistemas de CLAE para as determinações cromatográficas, como já é observado com sucesso na cromatografia gasosa (SKOOG, 2009). Da junção dessas eficientes técnicas de separação e detecção origina um sistema analítico

denominado Cromatografia Líquida acoplada a Detecção de Massas, ou LCOMMS (SKOOG, 2009).

A presença de métodos analíticos que empregam a técnica é cada vez mais presente em referências importantes, como na *Official Methods of AOAC International*.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. Qualidade analítica

As análises que subsidiam este estudo foram realizadas pelo Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança alimentar (Lacqsa), laboratório de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a análise de micotoxinas. Em atendimento aos requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio, NBR ISO/IEC 17025, norma na qual o Lacqsa detém acreditação, são utilizados métodos e procedimentos apropriados para os ensaios dentro de seu escopo, comprovado via validação (BRASIL, 2011).

2.3.2. Soluções padrão

Soluções padrão de micotoxinas são preparadas e padronizadas por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível, conforme orienta procedimento oficial da AOAC (2005).

As soluções padrão são preparadas por injeção de solventes apropriados, nos frascos de padrão sólido, que são finamente particulados, seguindo-se de retirada de frações das soluções concentradas para preparo das soluções estoque, evitando-se dessa forma a abertura dos frascos contendo padrão sólido e a dispersão das partículas. As concentrações das soluções estoques devem ser calculadas após determinação das absorvâncias por espectrofotometria.

Todo o procedimento é realizado em capela, tendo-se o cuidado de evitar o acionamento do seu sistema de exaustão ou iluminação, que pode comprometer a integridade da solução pela evaporação de solvente volátil ou degradação da toxina, e mantendo sempre precauções como utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) e evitando qualquer contato

dos padrões com a pele e/ou olhos. As soluções padrão de micotoxinas são armazenadas em freezer, temperatura $\leq -15^{\circ}\text{C}$ e protegidas da luz do sol e ultravioleta. Os frascos para acondicionamento das soluções padrão são previamente lavados e tratados com ácido sulfúrico 2 mol L^{-1} ou silanizados, a fim de se evitar adesão do soluto nas paredes do recipiente.

2.3.3. Determinação de micotoxinas

Existem diversas metodologias para a determinação de micotoxinas, mas para as análises que subsidiam este trabalho foram utilizados procedimentos fundamentados em cromatografia líquida de alta eficiência. As metodologias divergem entre si em virtude da especificidade dos materiais e métodos empregados, porém, podem ser resumidas nas etapas de extração, purificação, separação, detecção, quantificação e confirmação.

2.4. Arroz

Em números publicados pelo FAO em 2014, o Brasil ocupava o novo lugar entre os maiores produtores mundiais de arroz no ano de 2013, com uma produção estimada de 11.758.663 de toneladas. A produção nacional desta *commodite* agrícola tem aumentado progressivamente, como pode ser visto na figura 6.

Este importante componente da dieta nacional tem como característica de seu processamento a divisão do produto em diversos fragmentos que recebem destinação diferente na cadeia produtiva.

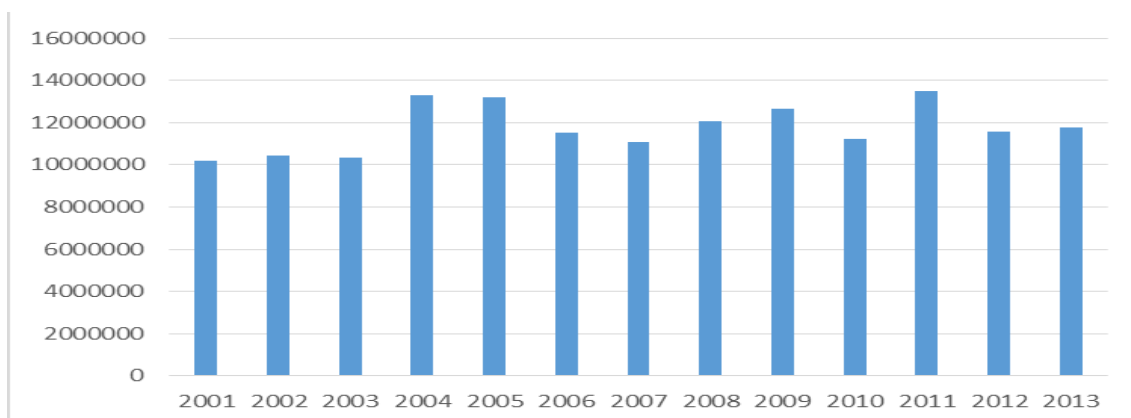


Figura 6: Produção nacional de arroz entre 2001 e 2013

Fonte: FAO (2014)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de 1998 a 2013, em atendimento a programas fiscais e de monitoramento (PNCRC Animal e Vegetal), aproximadamente 8.500 amostras de origem vegetal e animal contemplando as categorias de frutas secas, castanhas, leguminosas, cereais, produtos a base de cereais, café, ração, insumos para ração, tecido animal e leite foram avaliadas quanto a ocorrência e co-ocorrência de micotoxinas, sob a ótica dos LMTs estabelecidos pela Resolução N° 07, de 9 de março de 2011 e pela União Européia (EU1881/2006, EU165/2010, EU1058/2012 e EU212/2014).

A distribuição das amostras entre as matrizes foi relacionada na Tabela 6.

Tabela 6: Número total de amostras analisadas para cada uma das matrizes.

Matriz	N° de amostras	Matriz	N° de amostras
Café beneficiado	2979	Nozes	58
Milho	1012	Damasco	54
Castanha do Brasil sem casca	852	Milho de pipoca	53
Arroz	635	Café torrado	49
Amendoim	471	Ração	35
Feijão	347	Pistaches	32
Trigo	303	Tâmara	32
Uvas	301	Café solúvel	31
Castanha do Brasil com casca	275	Figo	30
Leite fluído	236	Avelã	29
Farelo	175	Especiaria	25
Ameixa	158	Quirera	17
Coco	157	Silagem	12
Amêndoa	111	*Demais castanhas	8
Fígado de aves	92	**Demais frutas secas	6
Fígado suíno	86	Feno	1
Milho processado	68	Lentilha	1

*Exemplo: Castanha portuguesa

**Exemplo: Maçã

Dentre as análises realizadas, foi constatado que o percentual de amostras que apresentaram algum nível de contaminação, maior ou igual ao limite de quantificação (LQ) dos métodos utilizados nas análises, para AFT (LQ =

1,44 $\mu\text{g kg}^{-1}$), AFM1 (LQ = 0,02 $\mu\text{g kg}^{-1}$), OTA (LQ = 0,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ café torrado, LQ = 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ café solúvel e 0,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ demais produtos), FB (LQ = 100 μgkg^{-1}), ZON (LQ = 9,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$), DON (LQ = 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e citreoviridina (CTV) (LQ = 8,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) foi de aproximadamente 22, 36, 67, 98, 23, 27 e 11%, respectivamente. No caso da contaminação por OTA merece atenção a grande quantidade amostras de café beneficiado analisadas, 2976 dentre as 4075 no total, e o comportamento especial desta matriz, que, quando observada individualmente apresenta 83% de contaminação, contra 22% das demais matrizes.

Os resultados observados quanto á contaminação pelas toxinas analisadas está representado nas tabelas 8 e 9 e expressos na figura 9. Dos diversos produtos analisados, o mais elevado nível de contaminação por AFT observado nos alimentos analisados foi 9266 $\mu\text{g kg}^{-1}$ determinado em amostra de milho que também apresentou maior nível de contaminação de FB (50000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) enquanto que para OTA o maior nível de contaminação determinado foi 718 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em café beneficiado, para ZON 15650 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em arroz, para DON 1894 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em farelo de trigo, já para CTV foi determinado 51 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em farelo de arroz como maior contaminação. Já para os produtos de origem animal, (leite e fígado bovino e de aves) foi determinada a contaminação máxima de 2,46 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para AFM1 em amostra de leite e não foi determinada contaminação de AFB1 ou OTA nas amostras de fígado, como pode ser acompanhado pelas tabelas 7 e 8.

Tabela 7: Determinações realizadas entre 1998 e 2013 em matrizes animais e vegetais para AFT, AFM1, OTA, FB, DON, ZON e CTV.

AFT				
Matriz	Nº amostras	Nº positivas	% positivas	Média ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Castanha do Brasil sem casca	851	352	41,36%	94,83
Milho	693	184	26,55%	33,17
Arroz	633	57	9,00%	1,70
Amendoim	471	205	43,52%	50,18
Uvas	301	1	0,33%	0,02
Feijão	298	38	12,75%	3,35
Castanha do Brasil com casca	275	127	46,18%	49,00
Trigo	255	1	0,39%	0,01
Farelo	174	44	25,29%	10,81
Ameixa	158	1	0,63%	0,03
Coco	157	0	0,00%	0,00

Tabela 7: Determinações realizadas entre 1998 e 2013 em matrizes animais e vegetais para AFT, AFM1, OTA, FB, DON, ZON e CTV. Continuação

Matriz	N° amostras	N° positivas	% positivas	Média ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Amêndoa	111	1	0,90%	0,42
Nozes	58	1	1,72%	0,03
Damasco	54	0	0,00%	0,00
Milho de pipoca	51	4	7,84%	0,45
Milho processado	50	9	18,00%	4,82
Ração	35	7	20,00%	6,29
Tâmara	32	0	0,00%	0,00
Pistaches	32	7	21,88%	17,31
Figo	30	12	40,00%	15,73
Avelã	29	0	0,00%	0,00
Café beneficiado	27	0	0,00%	0,00
Especiaria	25	0	0,00%	0,00
Quirera	17	10	58,82%	6,25
Silagem	11	1	9,09%	0,40
Lentilha	1	0	0,00%	0,00
Feno	1	0	0,00%	0,00
Total	4844	1067	22,03%	30,25
AFM1				
Matriz	N° amostras	N° positivas	% positivas	Média ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Leite fluído	236	86	36,44%	0,05
Total	236	86	36,44%	0,00
OTA				
Matriz	N° amostras	N° positivas	% positivas	Média ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Café beneficiado	2976	2497	83,90%	4,79
Milho	243	17	7,00%	2,88
Feijão	203	69	33,99%	1,60
Arroz	153	72	47,06%	1,00
Fígado de aves	92	0	0,00%	0,00
Trigo	91	8	8,79%	0,05
Fígado suíno	86	0	0,00%	0,00
Café torrado	49	21	42,86%	1,32
Farelo	40	30	75,00%	4,80
Café solúvel	31	23	74,19%	10,21
Milho processado	28	0	0,00%	0,00
Quirera	17	8	47,06%	0,48
Uvas	16	14	87,50%	5,75
Damasco	13	2	15,38%	0,08
Milho de pipoca	13	1	7,69%	0,03
Ração	12	6	50,00%	0,21

Tabela 7: Determinações realizadas entre 1998 e 2013 em matrizes animais e vegetais para AFT, AFM1, OTA, FB, DON, ZON e CTV. Continuação

Matriz	N° amostras	N° positivas	% positivas	Média (µg.kg⁻¹)
Figo	1	0	0,00%	0,00
Tâmara	1	0	0,00%	0,00
Castanha do Brasil sem casca	1	1	100,00%	0,72
Lentilha	1	0	0,00%	0,00
Silagem	1	0	0,00%	0,00
Total	4075	2770	67,98%	35,96
FB				
Matriz	N° amostras	N° positivas	% positivas	Média (µg.kg⁻¹)
Milho	444	440	99,10%	3678,63
Milho processado	12	12	100,00%	3390,83
Feijão	2	1	50,00%	30350,00
Arroz	1	1	100,00%	3700,00
Silagem	1	0	0,00%	0,00
Total	460	454	98,70%	35,02
ZON				
Matriz	N° amostras	N° positivas	% positivas	Média (µg.kg⁻¹)
Milho	536	67	12,50%	18,52
Arroz	86	31	36,05%	522,66
Trigo	52	14	26,92%	10,30
Farelo	44	41	93,18%	472,74
Ração	32	15	46,88%	121,48
Quirera	17	6	35,29%	7,38
Milho processado	10	1	10,00%	16,69
Silagem	7	4	57,14%	239,63
Milho de pipoca	1	1	100,00%	27,00
Feno	1	1	100,00%	90,05
Total	786	181	23,03%	104,57
DON				
Matriz	N° amostras	N° positivas	% positivas	Média (µg.kg⁻¹)
Arroz	140	15	10,71%	28,10
Milho	118	13	11,02%	22,01
Trigo	104	84	80,77%	510,98
Farelo	46	6	13,04%	116,01
Ração	21	8	38,10%	115,00
Quirera	16	0	0,00%	0,00
Milho processado	5	0	0,00%	0,00
Silagem	2	0	0,00%	0,00
Feno	1	0	0,00%	0,00
Total	453	126	27,81%	148,84

Tabela 7: Determinações realizadas entre 1998 e 2013 em matrizes animais e vegetais para AFT, AFM1, OTA, FB, DON, ZON e CTV. Continuação

Matriz	N° amostras	CTV		
		N° positivas	% positivas	Média ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Arroz	79	3	3,80%	0,39
Farelo	39	10	25,64%	4,11
Quirera	16	2	12,50%	1,21
Total	134	15	11,19%	1,57

Tabela 8: Resultados obtidos para as determinações de micotoxinas em alimentos realizadas pelo Lacqsa entre 1998 e 2013 em amostras fiscais de monitoramento.

Micotoxina	N° amostras	N° positivas	% positivas	Mínimo ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Máximo ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
AFT	4844	1067	22,03%	1,46	9266,00
AFM1	236	86	36,44%	0,02	2,46
OTA	4075	2770	67,98%	0,14	718,14
FB	460	454	98,70%	200,00	50000,00
ZON	786	181	23,03%	9,20	15650,60
DON	453	126	27,81%	120,00	1894,60
CTV	134	15	11,19%	8,10	51,00

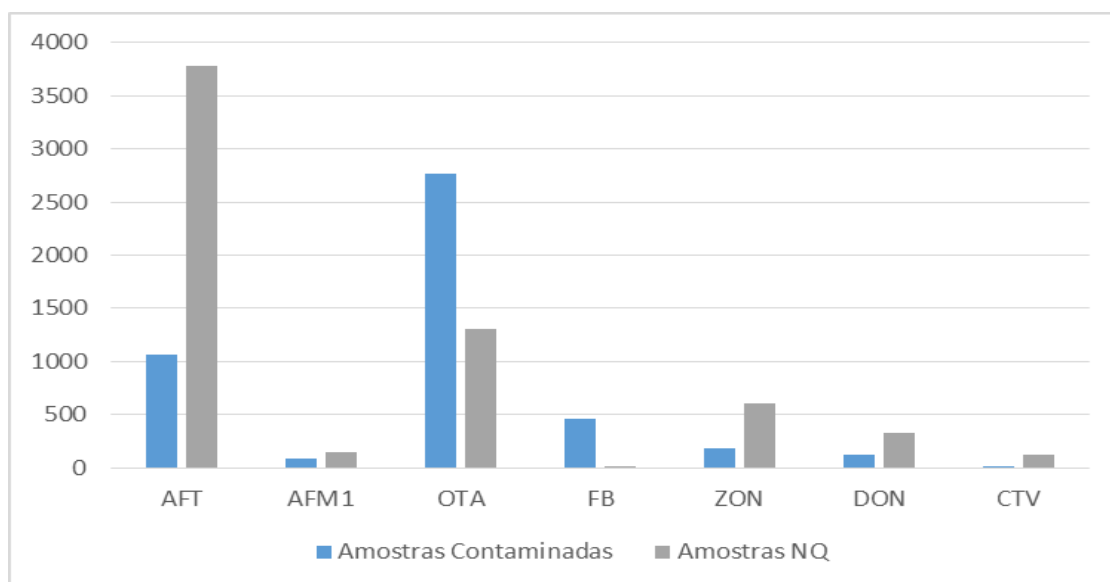


Figura 7: Resultados obtidos para as determinações de micotoxinas em alimentos realizadas pelo Lacqsa entre 1998 e 2013 em amostras fiscais de monitoramento.

Considerando os diferentes produtos analisados foi observado co-ocorrência entre as micotoxinas AFT e FB, FB e ZON para as amostras de milho. Já para as amostras de trigo foi observada correlação para OTA e DON, ZON e DON, OTA e ZON, não sendo observada nenhuma relação envolvendo a presença de AFT. As amostras de arroz e suas frações apresentaram correlação para OTA e DON; AFT e OTA; AFT, OTA e ZON. As correlações que apresentaram percentual inferior a 2% não foram apresentadas. Como apresentado na tabela 10, o feijão foi analisado somente para AFT e OTA e apresenta uma co-ocorrência significativa (6,3%) entre estas toxinas, sendo esta correlação observada ainda nas amostras de milho e arroz. Os resultados podem ser acompanhados pela tabela 9.

Tabela 9: Co-ocorrência de AFT, OTA, FB, ZON e DON observada em amostras de milho, arroz e feijão analisadas pelo Lacqsa.

Produto	Micotoxinas	Nº amostras	Nº de amostras com apresentação de co-ocorrência.	(%) de amostras com apresentação de co-ocorrência.
Milho	AFT, FB	214	51	23,83
	OTA, DON	139	10	7,19
	AFT, OTA e ZON	84	17	20,24
Arroz	AFT, OTA	152	32	21,05
	AFT, ZON	85	19	22,35
	OTA, ZON	84	23	27,38
Feijão	AFT, OTA	159	10	6,29

Ao se observar os limites máximos toleráveis estabelecidos pela ANVISA por meio da Resolução Nº 07, de 9 de março de 2011, normativa vigente no Brasil, as amostras podem ser classificadas como “Violadas” ou “Não violadas”, ao apresentarem ou não níveis de contaminação superiores aos LMTs. Foram obtidos os resultados apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10: Número de amostras analisadas e amostras violadas conforme determinações realizadas pelo Lacqsa entre 1998 e 2013, ao se considerar as contaminações por AFT, AFM1, OTA, FB, DON e ZON e a Resolução N° 07, de 9 de março de 2011

Matriz	Amostras	N° violados	% violados
Café beneficiado	2979	351	11,78%
Milho	1012	61	6,03%
Castanha do Brasil sem casca	852	261	30,63%
Arroz	635	38	5,98%
Amendoim	471	97	20,59%
Trigo	303	0	0,00%
Uvas	301	2	0,66%
Castanha do Brasil com casca	275	53	19,27%
Leite fluído	236	5	2,12%
Farelo	175	0	0,00%
Ameixa	158	0	0,00%
Coco	157	0	0,00%
Amêndoas	111	1	0,90%
Fígado de aves	92	0	0,00%

Tabela 10: Número de amostras analisadas e amostras violadas conforme determinações realizadas pelo Lacqsa entre 1998 e 2013, ao se considerar as contaminações por AFT, AFM1, OTA, FB, DON e ZON e a Resolução N° 07, de 9 de março de 2011. Continuação.

Matriz	Amostras	N° violados	% violados
Fígado suíno	86	0	0,00%
Milho processado	68	5	7,35%
Nozes	58	0	0,00%
Damasco	54	0	0,00%
Milho de pipoca	53	0	0,00%
Café torrado	49	2	4,08%
Ração	35	0	0,00%
Tâmara	32	0	0,00%
Pistaches	32	7	21,88%
Café solúvel	31	9	29,03%
Figo	30	10	33,33%
Avelã	29	0	0,00%
Especiaria	25	0	0,00%
Quirera	17	8	47,06%
Silagem	12	0	0,00%
Lentilha	1	0	0,00%

Tabela 11: Número de amostras analisadas e amostras violadas conforme determinações realizadas pelo Lacqsa entre 1998 e 2013, ao se considerar as contaminações pelas toxinas AFT, AFM1, OTA, FB, DON e ZON individualmente e a Resolução N° 07, de 9 de março de 2011.

AFT			
Matriz	N° determinações	N° violados	% violados
Castanha do Brasil sem casca	851	261	30,67%
Milho	693	55	7,94%
Arroz	633	32	5,06%
Amendoim	471	97	20,59%
Uvas	301	0	0,00%
Feijão	298	20	6,71%
Castanha do Brasil com casca	275	53	19,27%
Trigo	255	0	0,00%
Farelo	174	0	0,00%
Ameixa	158	0	0,00%
Coco	157	0	0,00%
Amêndoas	111	1	0,90%
Nozes	58	0	0,00%
Damasco	54	0	0,00%
Milho de pipoca	51	0	0,00%
Milho processado	50	1	2,00%
Ração	35	0	0,00%
Tâmara	32	0	0,00%
Pistaches	32	7	21,88%
Figo	30	10	33,33%
Avelã	29	0	0,00%
Café beneficiado	27	0	0,00%
Especiaria	25	0	0,00%
Quirera	17	8	47,06%
Silagem	11	0	0,00%
Lentilha	1	0	0,00%
Feno	1	0	0,00%
TOTAL	4844	549	11,33%
AFM1			
Matriz	N° determinações	N° violados	% violados
Leite fluído	236	5	2,12%
TOTAL	236	5	2,12%

Tabela 11: Número de amostras analisadas e amostras violadas conforme determinações realizadas pelo Lacqsa entre 1998 e 2013, ao se considerar as contaminações pelas toxinas AFT, AFM1, OTA, FB, DON e ZON individualmente e a Resolução N° 07, de 9 de março de 2011. Continuação.

OTA			
Matriz	N° determinações	N° violados	% violados
Damasco	13	0	0,00%
Ameixa	2	0	0,00%
Figo	1	0	0,00%
Tâmara	1	0	0,00%
TOTAL	236	5	2,12%
OTA			
Matriz	N° determinações	N° violados	% violados
Café beneficiado	2976	351	11,79%
Milho	243	1	0,41%
Feijão	203	5	2,46%
Arroz	153	3	1,96%
Fígado de aves	92	0	0,00%
Trigo	91	0	0,00%
Fígado suíno	86	0	0,00%
Café torrado	49	2	4,08%
Farelo	40	0	0,00%
Café solúvel	31	9	29,03%
Milho processado	28	0	0,00%
Quirera	17	0	0,00%
Uvas	16	2	12,50%
Damasco	13	0	0,00%
Milho de pipoca	13	0	0,00%
Ração	12	0	0,00%
Frutas secas Demais	5	0	0,00%
Ameixa	2	0	0,00%
Figo	1	0	0,00%
Tâmara	1	0	0,00%
Castanha do Brasil sem casca	1	0	0,00%
Lentilha	1	0	0,00%
Silagem	1	0	0,00%
TOTAL	4075	373	9,15%

Tabela 11: Número de amostras analisadas e amostras violadas conforme determinações realizadas pelo Lacqsa entre 1998 e 2013, ao se considerar as contaminações pelas toxinas AFT, AFM1, OTA, FB, DON e ZON individualmente e a Resolução N° 07, de 9 de março de 2011. Continuação.

FB			
Matriz	N° determinações	N° violados	% violados
Milho	444	5	1,13%
Milho processado	12	4	33,33%
Feijão	2	0	0,00%
Arroz	1	0	0,00%
Silagem	1	0	0,00%
TOTAL	460	9	1,96%
ZON			
Matriz	N° determinações	N° violados	% violados
Milho	536	0	0,00%
Arroz	86	10	11,63%
Trigo	52	0	0,00%
Farelo	44	0	0,00%
Ração	32	0	0,00%
Quirera	17	0	0,00%
Milho processado	10	0	0,00%
Silagem	7	0	0,00%
Milho de pipoca	1	0	0,00%
Feno	1	0	0,00%
TOTAL	786	10	1,27%
DON			
Matriz	N° determinações	N° violados	% violados
Arroz	140	0	0,00%
Milho	118	0	0,00%
Trigo	104	0	0,00%
Farelo	46	0	0,00%
Ração	21	0	0,00%
Quirera	16	0	0,00%
Milho processado	5	0	0,00%
Silagem	2	0	0,00%
Feno	1	0	0,00%
TOTAL	453	0	0,00%

A análise dos dados, quanto à violação das amostras pela contaminação por micotoxinas em níveis superiores ao LMT, quando observados os alimentos de maior relevância na dieta do brasileiro, como o arroz, o milho e o trigo. Apresenta os seguintes resultados. Estes dados são apresentados na tabela 12.

Tabela 12: Violação de amostras de arroz, milho e trigo, decorrente da contaminação por AFT, OTA, FB, ZON e DON.

AFT			
Matriz	Nº determinações	Nº violados	% violados
Arroz	633	32	5,06%
Milho	693	55	7,94%
Trigo	255	0	0,00%
OTA			
Matriz	Nº determinações	Nº violados	% violados
Arroz	153	3	1,96%
Milho	243	1	0,41%
Trigo	91	0	0,00%
FB			
Matriz	Nº determinações	Nº violados	% violados
Milho	444	5	1,13%
ZON			
Matriz	Nº determinações	Nº violados	% violados
Arroz	86	10	11,63%
Milho	536	0	0,00%
Trigo	52	0	0,00%
DON			
Matriz	Nº determinações	Nº violados	% violados
Arroz	140	0	0,00%
Trigo	104	0	0,00%

Foi realizado estudo especial das amostras de arroz analisadas pelo laboratório quanto a sua contaminação por AFT, sobre tudo na concentração da contaminação em suas frações. A grande quantidade de toxinas analisadas simultaneamente nesta *commoditie* ajuda a oferecer uma visão holística de sua segurança quanto à contaminação por micotoxinas. A distribuição da contaminação de arroz por AFT em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pode ser vista na figura 8.

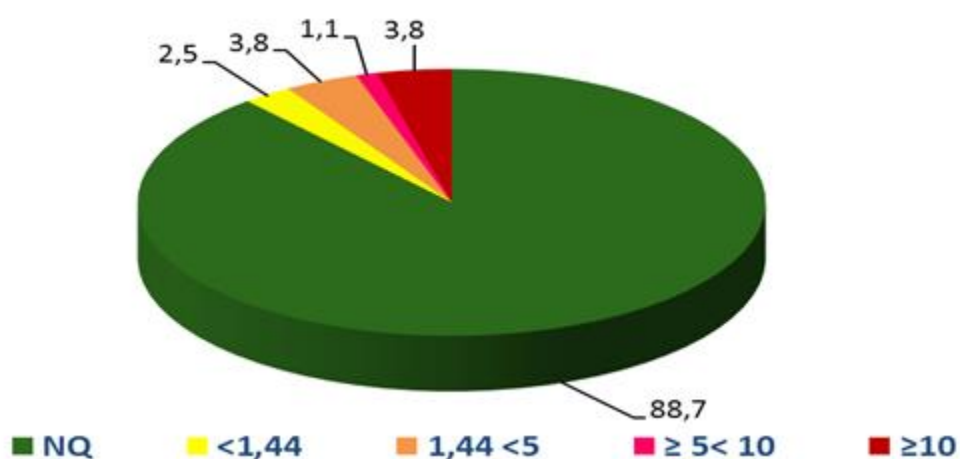


Figura 8: Contaminação de arroz por AFT

A distribuição da contaminação de arroz por OTA em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pode ser vista na figura 9.

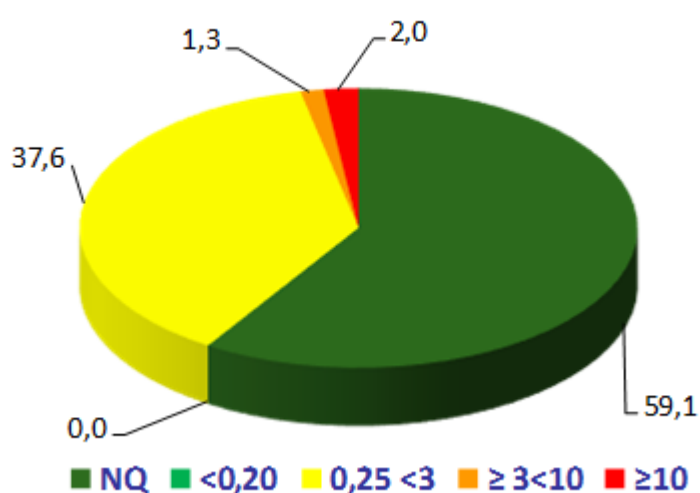


Figura 9: contaminação de arroz por OTA

A distribuição da contaminação de arroz por ZON em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pode ser vista na figura 10.

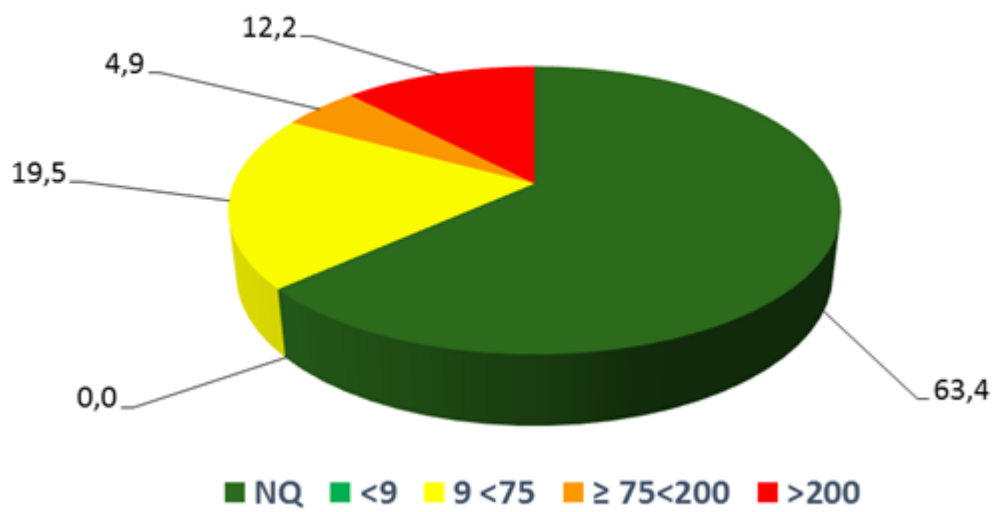


Figura 10: Contaminação de arroz por ZON

A contaminação de arroz por DON em $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ pode ser vista na figura 11.

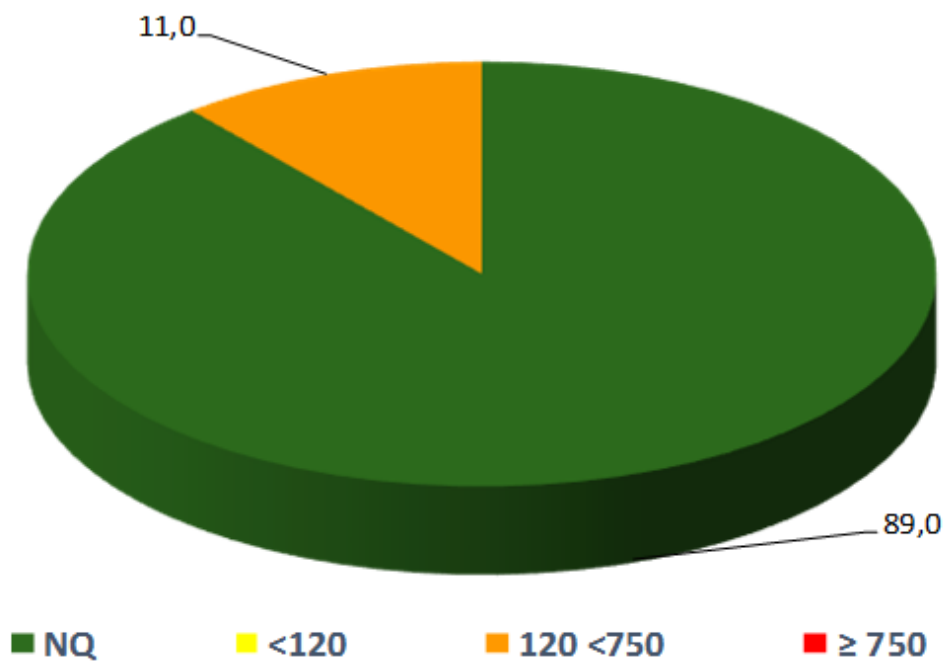


Figura 11: Contaminação de arroz por DON

Já a distribuição contaminação de arroz por CTV em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pode ser vista na figura 12.

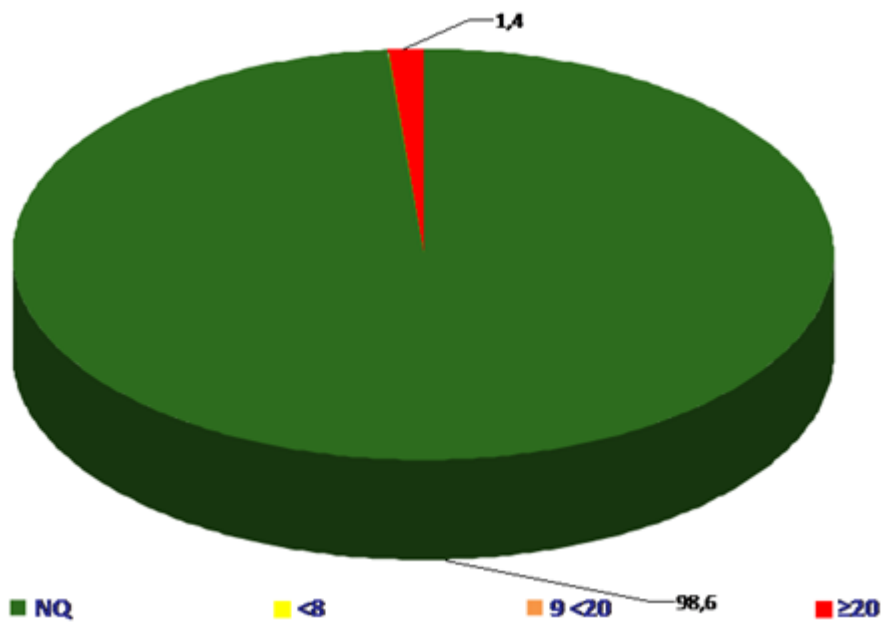


Figura 12: contaminação de arroz por CTV

Desta forma, a distribuição da contaminação do arroz por micotoxinas pode ser visto, de maneira geral, na figura 13:

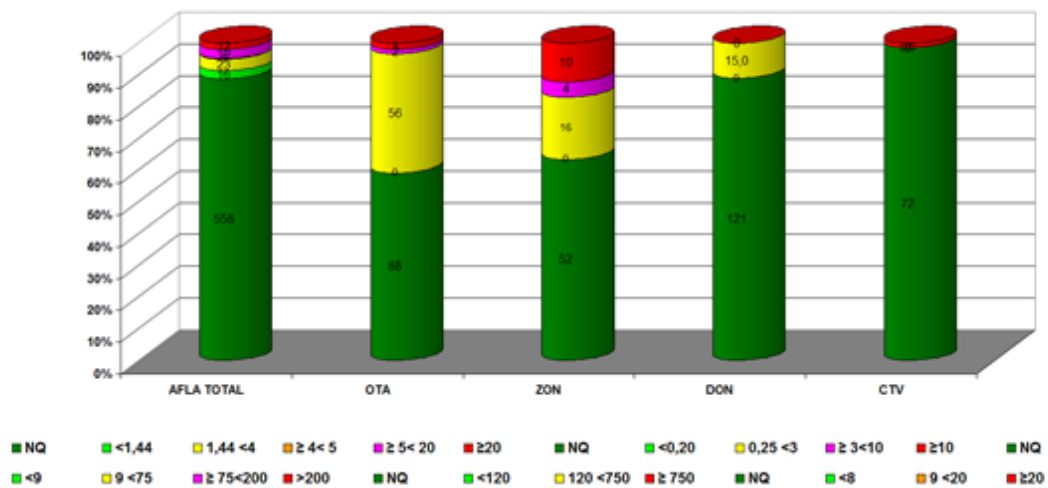


Figura 13: Contaminação de arroz por AFT, OTA, ZON, DON e CTV em $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Foi realizada a análise de frações de uma mesma amostra de arroz quanto a presença de AFT, os resultados são apresentados na figura 14.

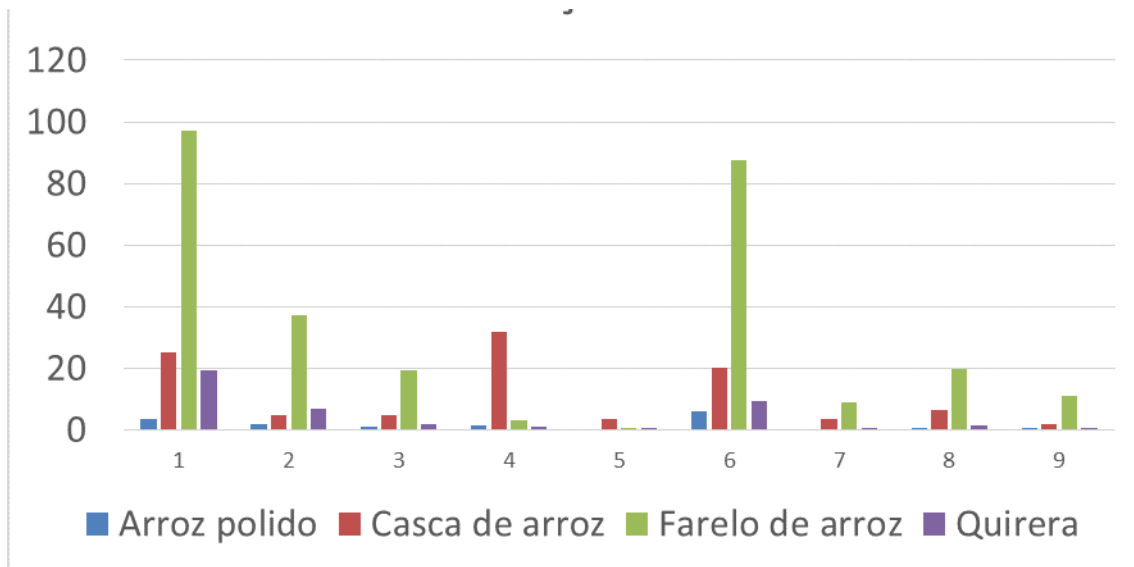


Figura 14: AFT em arroz e suas frações

4. CONCLUSÃO

Observa-se a grande quantidade de alimentos contaminados por micotoxinas, de maneira geral, confirmando as afirmativas de uma grande presença destes contaminantes. Porém, os métodos utilizados para a determinação das micotoxinas apresentam baixos limites de quantificação, o que torna possível a investigação de micotoxinas em concentrações mínimas propiciando a obtenção de altos valores percentuais de amostras contaminadas, o que não reflete diretamente a quantidade de amostras impróprias ou inseguras para o consumo, que excedem os LMT.

Quando analisado o caso específico do arroz, se pode notar a pequena quantidade de produtos impróprios para o consumo. Ao se considerar as amostras cujas frações foram analisadas separadamente pôde ser observada a maior concentração de AFT na casca e no farelo deste produto, frações não destinadas ao consumo humano, sendo o arroz polido o produto com menor concentração de toxinas, o que leva a concluir que neste caso o processamento do produto diminui a concentração de toxinas no alimento consumido pela população.

Até o momento, o monitoramento horizontal de micotoxinas se restringe aos contaminantes mais comumente legislados e não abrange todas as toxinas monitoradas internacionalmente. A prospecção de micotoxinas e seus metabólicos se faz necessária para avaliar problemas e implicações de risco dos produtos de origem animal e vegetal, e conseqüentemente a qualidade dos alimentos consumidos e exportados pelo Brasil e evitar problemas de exposição a multimicotoxinas.

Os resultados determinados apontam para a necessidade de manter o monitoramento da contaminação por micotoxinas dos produtos de origem vegetal e animal no Brasil para a garantia da segurança da saúde do consumidor.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC – **Association of Official Analytical Chemist**, 1998, Natural Toxins. Official Methods of AOAC International. Chapter 49, pp. 39-40. 16th edition, 4th revision.
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemist**, 2000. Natural Toxins. Official Methods of AOAC International. Chapter 49, pp. 1-64, 17th edition.
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemist**, 2005. Natural Toxins. Official Methods of AOAC International. Chapter 49.2.29, pp. 29-37, 18th edition. Current through revision 3, 2010, 999.07.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de coleta de amostras do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem vegetal** - Brasília: Mapa/ACS, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de garantia da qualidade analítica**. - Brasília: MAPA/ACS, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa Nº 42, de 31 de dezembro de 2008** Institui o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRCOMVegetal.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa Nº 42 de 20 de dezembro de 1999**. Altera Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PCNR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado - PCRP. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 dez. 1999, seção 1, pág. 213.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Resolução Nº 07, de 9 de março de 2011** Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, nº 36, 09 março de 2011, seção 01, p.66/67.
- C.A. MALLMANN, T.G. VASCONCELOS, D. TYSKA, A. C. MARTINS; **Comparação de metodologias analíticas e de amostragem para micotoxinas Laboratório de**

- Análises Micotológicas** - LAMIC, Universidade Federal de Santa Maria / DACT & DMPV, Santa Maria – RS, Brasil.
- CAROL H. COLLINS, GILBERTO L. BRAGA, PIERINA S. BONATO. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas. 2006.
- CAST - Council for Agricultural Science and Technology: **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems** - Ames, Iowa, 2003.
- CODEX - Codex Alimentarius; **CACOMGL 62:2007; Working Principles for Risk Analysis for Food Safety for Application by Governments**; 2007.
- CODEX - Codex Alimentarius; **CODEX STAN 192:1995 General Standard for Food Additives**; 1995.
- CODEX - Codex Alimentarius; **CODEX STAN 193:1995 General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed**; 1995.
- CODEX - Codex Alimentarius; **Prevention and Reduction of Food and Feed Contamination**; Joint FAO/WHO Food Standards Programme; 1th edition; Rome; Italy; 2012.
- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos. – v. 1, n.1 (2013-)**; Brasília : Conab, 2013-v.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations; **Manual on the application of the HACCP system in Mycotoxin prevention and control**; Rome, 2001.
- FERNANDES, R, R. **Micotoxinas: a situação atual da legislação e metodologias analíticas**. 2007. 252p. Dissertação (Mestre em química e qualidade dos alimentos) - Universidade de Aveiro, Portugal.
- Franz Berthiller, Colin Crews, Chiara Dall'Asta, Sarah De Saeger, Geert Haesaert, **Masked mycotoxins: A review**; Petr Karlovsky, Isabelle P. Oswald, Walburga Seefelder, Gerrit Speijers and Joerg Stroka, Mol. Nutr. Food Res. 2012, 00, 1–22; 2012.
- Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. - Brasília: Mapa/ACS, 2011.
- IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Volume 56, 1997.

International Organization for Standardization. - **ISO 950:1979; Cereals - Sampling (as grain); 1979**

Joint FAO/WHO **Expert Committee on Food Additives Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**: Geneva, Switzerland; 2001

PATRICIA A. MURPHY PH.D. , SUZANNE HENDRICH PH.D. , CINDY LANDGREN PH.D. AND CORY M. BRYANT; **Food mycotoxins: an update**; Journal of Food Science vol. 71, n. 5, 2006.

PATRICIA A.MURPHY, PH.D., SUZANNE HENDRICH, PH.D., CINDY LANDGREN, PH.D., AND CORY M. BRYANT; **Food Mycotoxins: An Update**; Journal Of Food Science; Vol. 71;Nr. 5; 2006.

Pitt, J I (1996) **What are mycotoxins?** Australian Mycotoxin Newsletter. 7(4), pp 1.

R. Russell, M. Paterson, Nelson Lima; **How will climate change affect mycotoxins in food?**; 2010.

Sarah, De Saeger and Hans P. van Egmond. **MASKED MYCOTOXINS**; World Mycotoxin Journal, August 2012; 5 (3): 203-206. ISSN 1875-0710

SCUSSEL, V. M.; da ROCHA, M. L. U.; LORINI, I.; ROSA, C. A. da R.; CARVAJAL, M. M. (Ed.). **Atualidades em micotoxinas e armazenagem qualitativa de grãos II**. Florianópolis: ABMAG, 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**; Bookman; 5th edição; Porto Alegre; 2002.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Pioneira; 8th edição, São Paulo. 2006.

Vocabulário Internacional de Metrologia: **Conceitos fundamentais e gerais de termos associados** (VIM 2012). Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012.

WHO - World Health Organization – **WHO technical report series; no. 947**; Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; Switzerland; 2007.

WHO - World Health Organization – **WHO technical report series; no. 959**; Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; India; 2011.

WHO - World Health Organization, and FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations; **Safety evaluation of certain contaminants in food** / prepared by

the Seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA); India, 2011.

WHO - World Health Organization; **Safety evaluation of certain food additives / prepared by the sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).** India; 2008.