



# Identificação de Fungos Filamentosos e Quantificação de Ocratoxina A em Produtos Cárneos ao Longo do Período de Cura

Pedro Maurício Cardoso da Costa

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança  
Alimentar*

Orientado por

Professora Doutora Paula Cristina Azevedo Rodrigues

Professor Doutor Alfredo Jorge da Costa Teixeira

Bragança  
2014

Para a minha Carminho...



### **Agradecimentos**

Quero, em primeiro lugar, agradecer à minha Orientadora Professora Doutora Paula Rodrigues, pela total disponibilidade ao longo deste ano para orientar esta dissertação. Quero agradecer também o acompanhamento prestado durante a realização dos trabalhos laboratoriais, os incentivos, aconselhamentos, e toda a sabedoria que me transmitiu.

De igual forma, quero agradecer ao meu Co-orientador Professor Doutor Alfredo Teixeira pelo apoio e a sua inteira disponibilidade ao longo deste trabalho.

Devo, ainda, agradecer:

A todas as pessoas do Laboratório de Microbiologia, pela disponibilidade e paciência, à disponibilização das instalações e dos meios necessários à realização deste trabalho. Também devo agradecer à Universidade do Minho pela sua disponibilização.

A todas as pessoas que se cruzaram comigo durante toda a minha vida académica. 6 Anos de muita alegria, conquistas e também algumas tristezas mas sempre superadas com grandes amigos. Um muito Obrigado!

À minha Miga Cynthia, porque sem ela não teria a força e incentivo para chegar ao fim desta difícil etapa. Pela tua grande e bela amizade, sempre a primeira a ajudar mesmo quando as coisas não estavam bem para o teu lado. Obrigado pela tua palavra amiga, desabafos, brincadeiras e acima de tudo à tua Lealdade e Confiança!

Ao meu Best Friend Afonso, por me ter acompanhado sempre nesta longa etapa, cheio de grandes alegrias e brincadeiras. Obrigado pelos teus conselhos, pelos bons momentos de parvoíces que tínhamos e claro à nossa grande Amizade e Confiança. Espero que seja para sempre!

Ao meu Brou Tiago, que apesar das nossas discussões, sempre tiveste um lugar muito importante nesta etapa, sempre que precisei estiveste lá. Obrigado pela Amizade, a palavra de conforto, às tentativas de me animares e me fazeres rir e principalmente a paciência de me aturares!

Ao meu golfinho doméstico, por todos os mimos e beijos que davas, eu adorava! Obrigado por estares lá quando mais precisei, á tua palavra de conforto na altura certa, pelos momentos de parvoíce, pois divertíamo-nos muito e um Grande Obrigado pela amizade que nós os dois construímos, espero que seja para sempre!

À menina Zelza, menino Rui e menina Di, que me ajudaram em tudo que precisei, aos conselhos e dicas para a realização deste trabalho. À menina Zelza pelas nossas maluqueiras e ataques de riso. Ao menino Rui por me aturar nas aulas de mestrado e me ajudar quando precisei. À menina Di por me ter feito muita companhia e me ajudado durante todo este percurso, mas principalmente a companhia nos fins de semanas, e termos vivido e presenciado momentos de pura alegria e loucura.

Á Gi, à Mel, ao Tózinho e à Zu pela amizade, carinho e ajuda em tudo o que precisei... vocês sempre estiveram lá. Obrigado por serem como são e nunca mudem, vocês são especiais!

À Lili, por toda a ajuda, carinho e dicas ao longo destes 2 anos. Um muito obrigado não só pela ajuda, mas pela disponibilidade e Amizade.

À Andreia Tomás, pela disponibilidade e preciosa ajuda no Laboratório de Química, mas principalmente pela Companhia!

Aos meus pais, pois sem eles isto tudo não seria possível. Ao esforço deles para que eu seja feliz e tenha um futuro bom e promissor. Obrigado por nunca desistirem de mim, obrigado pelas palavras de conforto que me fizeram seguir em frente e acima de tudo ao vosso amor e dedicação por mim!

À minha irmã e ao meu cunhado, por me fazerem feliz com o novo elemento da família que vem a caminho! Obrigado pelo vosso apoio. À minha irmã, por ela ser mais que uma irmã, uma amiga, uma segunda mãe, uma confidente. Obrigado por estares sempre tão presente e me encheres de orgulho por seres quem és. Obrigado por me ajudares e me orientares neste longo caminho e que sejas sempre a pessoa que és para mim. Adoro-te muito meu amor!

## Resumo

Os Bolores são organismos que crescem numa grande variedade de alimentos. Como são maioritariamente aeróbios, crescem preferencialmente à superfície do alimento em contato com o ar, pelo que a assimilação de nutrientes é bastante acelerada.

Muitos dos bolores que se desenvolvem nos alimentos produzem micotoxinas, nomeadamente Ocratoxina A (OTA), com elevado grau toxigénico.

Este trabalho teve como principal objetivo a identificação dos bolores e a deteção e quantificação de OTA em produtos cárneos curados com origem no Nordeste Transmontano, mais especificamente presuntos de suíno e presuntos de caprino. Foram assim, analisadas 91 amostras: 14 amostras de presunto de caprino e 77 de presunto de suíno, com diferentes tempos de cura.

Os bolores foram isolados em meio de cultura DG18 e DRBC e identificados por métodos fenotípicos e moleculares. A deteção e quantificação de OTA foram efetuadas por extração da micotoxina em solução aquosa de metanol, purificação por colunas de imunoafinidade e análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Deteção por Fluorescência (HPLC-FLD).

Das amostras de presunto suíno, 15 apresentaram contaminação com OTA, sendo que 3 continham níveis de OTA bastante elevados, nomeadamente entre 25,4 µg/kg e 99,1 µg/kg. Em nenhuma das 14 amostras de presunto de caprino analisadas foi detetada contaminação com OTA.

No que se refere à caracterização da micobiota dos produtos em estudo, foram isolados 544 fungos filamentosos, dos quais foram identificados 172 fungos dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, pertencentes a 12 espécies diferentes. Os fungos com maior prevalência nas amostras analisadas foram *Aspergillus flavus* e *Penicillium commune*. *A. flavus* teve uma prevalência de 50% em amostras de presunto de caprino e 31% em suíno. O *P. commune* teve uma prevalência de 25% em presunto de caprino e 60% em presunto de suíno.

*Aspergillus westerdijkiae* e *Penicillium nordicum* foram as únicas espécies identificadas como sendo produtoras de OTA. *P. nordicum*, fungo mais frequentemente associado a contaminação de produtos cárneos curados, apresentou prevalência bastante baixa, Provavelmente por se tratar de um fungo difícil de isolar na presença de outros microrganismos.



## Abstract

Molds are organisms that grow in a wide variety of foods. As they are mostly aerobic they preferably grow on the surface of food in contact with air, where the assimilation of nutrients is very rapid.

Many of the molds that grow on foods produce mycotoxins, one example being Ochratoxin A (OTA), which shows a high toxigenic degree.

This study aimed to identify the mycobiota and to detect and quantify of OTA in cured meat products originating in the Trás-os-Montes, more specifically pork and goat ham. A total of 91 samples were analysed: 14 samples of goat ham and 77 of pork ham with different curing times.

Molds belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium* were isolated in DG18 and DRBC culture media and the most representative isolates were identified to the species level by phenotypic and molecular methods. OTA detection and quantification were performed by extracting the mycotoxin with aqueous methanol, purification by immunoaffinity columns and analysis by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (HPLC-FLD).

Among the pork ham samples, 15 were contaminated with OTA, and 3 contained very high levels of OTA, between 25.4 µg/kg and 99.1 µg/kg. None of the 14 samples of goat ham showed detectable levels of OTA.

With regard to the mycobiota characterisation, 172 of the 544 isolated molds were identified. Twelve different species of *Aspergillus* and *Penicillium* were identified. The most prevalent fungi in the samples were *Aspergillus flavus* and *Penicillium commune*. *A. flavus* had a prevalence of 50% in samples of goat ham and 31% in pork ham. *P. commune* had a prevalence of 25% in goat ham and 60% in ham pork.

*Aspergillus westerdijkiae* and *Penicillium nordicum* were the only species identified as OTA producers. *P. nordicum* most commonly associated with contamination of cured meat products showed very low prevalence, probably because its detection and isolation is very difficult when in the presence of other microorganisms.





**Índice**

<b>1. Introdução.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>7</b>
2.1. Importância dos Produtos Cárneos .....	7
2.2. Problemas de Segurança Alimentar .....	8
2.3. Micotoxinas .....	9
2.3.1. Ocratoxina A.....	9
2.3.2. Fungos que Produzem Ocratoxina A.....	11
2.3.3. Contaminação de produtos cárneos com OTA .....	12
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>15</b>
3.1. Plano de Amostragem .....	15
3.2. Pesquisa de fungos.....	17
3.2.1. Condições de Segurança.....	17
3.2.2. Isolamento e identificação de bolores .....	18
3.3. Detecção e quantificação de OTA nas amostras .....	22
3.3.1. Reagentes e Materiais.....	22
3.3.2. Condições de Segurança.....	22
3.3.3. Preparação da Amostra.....	22
3.3.4. Extração de OTA .....	23
3.3.5. Detecção e Quantificação por HPLC .....	23
<b>4. Resultados .....</b>	<b>27</b>
4.1. Micobiota dos presuntos .....	27
4.1.1. Isolamento e identificação de fungos .....	27
4.2. Prevalência dos bolores nas amostras de presunto de caprino e presunto de suíno. 30	
4.3. Detecção e Quantificação de OTA nas Amostras .....	31
<b>5. Discussão .....</b>	<b>37</b>

5.1. Bolors .....	37
5.2. Detecção e Quantificação de OTA nas amostras.....	38
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>45</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>49</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>55</b>

**Índice de Quadros**

Quadro 1: Lista de amostras de presunto de caprino, analisadas no presente estudo e suas características.....	15
Quadro 2: Lista de amostras analisadas no presente estudo e suas características.....	16
Quadro 3: Pares de <i>primers</i> usados neste estudo, e respectivos detalhes.....	21
Quadro 4: Programas de PCR utilizados para cada par de <i>primers</i> .....	21
Quadro 5: Exemplos de alguns resultados da Sequenciação. ....	29
Quadro 6: Prevalência (em percentagem) de bolores, por espécie, nas amostras de presunto de caprino e suíno. ....	30
Quadro 7: Resumo dos resultados de OTA para os vários tipos de amostras e seus tempos de cura. ....	33
Quadro 8: Resultados de OTA de mesmas amostras na 1ª e 2ª Colheita. ....	33
Quadro 9: Lista de amostras de presunto de suíno, analisadas no presente estudo, suas características e respectivas concentrações de OTA. ....	55
Quadro 10: Lista de amostras de presunto de suíno, analisadas no presente estudo, suas características e respectivas concentrações de OTA (continuação). ....	56
Quadro 11: Lista de amostras de presunto de caprino, analisadas no presente estudo, suas características e respectivas concentrações de OTA. ....	56



**Índice de Figuras**

Figura 1: Estrutura da Ocratoxina A (OTA)..... 10

Figura 2: Placa de DRBC onde os fungos foram semeados. .... 27

Figura 3: Exemplo de fungos em meio YES para identificação morfológica e  
determinação do perfil toxigénico. .... 28

Figura 4: Exemplo de uma placa de TLC para determinação do perfil toxigénico. .... 28

Figura 5: Gel de agarose a 1,2% com o resultado da amplificação da região ITS para  
alguns fungos em estudo. M: marcador de peso molecular 100 bp Ladder (Promega);  
Poços 1 a 19: amostras de fungos; Poços 8, 10, 14, 16 e 19: sem amplificação. .... 29

Figura 6: Exemplo de cromatograma obtido para solução padrão de OTA 10 ng/mL. . 31

Figura 7: Exemplo de cromatograma obtido para uma amostra naturalmente  
contaminada com OTA..... 32

Figura 8: Exemplo de cromatograma obtido para uma amostra onde não foi detetada  
contaminação com OTA..... 32



# Capítulo 1





## 1. Introdução

Os produtos de transformação cárnea ostentam uma grande variedade de sabores, texturas e formas, como consequência da diversidade das matérias-primas, dos ingredientes e do seu processamento de fabrico.

Estes produtos de transformação cárnea são mundialmente conhecidos pelo termo “salsicharia”, fazendo parte deste, os enchidos e todas as carnes curadas, como por exemplo os presuntos e as pás curadas. Em Portugal, mais propriamente Trás-os-Montes, a matéria-prima mais utilizada para a obtenção deste tipo de produtos é a carne de porco. Atualmente as matérias-primas de carne de ovino e de caprino, também começam a ser estudadas e trabalhadas na obtenção de produtos alternativos.

A nível de segurança alimentar, é muito importante manter a qualidade dos produtos e torná-lo seguro para o consumidor. Para isso é necessário implementar sistemas de controlo de segurança alimentar, como HACCP (Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controlo). Hoje em dia o consumidor é muito exigente o que leva a querer que os produtos sejam de elevada qualidade e de extrema segurança.

A contaminação dos produtos alimentares com micotoxinas tem um impacto muito forte para o consumidor pois existem toxinas de elevada toxicidade, provocando efeitos genotóxicos e carcinogénicos.

A região de Trás-os-Montes é reconhecida pelo grande peso na atividade agrária nacional, e cada vez mais os produtores agrícolas pretende desenvolver e valorizar os recursos existentes. Uma das principais matérias-primas desta região é o Porco Bísaro, recurso genético autóctone, que tem uma elevada aceitação no mercado.

Esta dissertação sobrevém no âmbito do Projeto PRODER "BISOVICAP - Novos Produtos: Processamento de carnes de suíno, ovino e caprino, para a produção de novos produtos. Presunto e paté". O consórcio promotor do Projeto é constituído pela empresa Bísaro, Salsicharia Tradicional e tem como co-promotor a ESA-IPB, representada pelo Laboratório de Tecnologia e Qualidade da Carcaça e da Carne (LTQCC). Contudo o principal objetivo deste projeto é a obtenção de novos produtos de carne transformados, como presunto de perna de ovino e caprino, presunto desossado e fatiado de porco Bísaro e paté de carne de ovino e caprino. Pretende-se contribuir para a sustentabilidade da economia regional, através do fabrico de dois novos produtos, baseados nas matérias-primas de carne de ovino e caprino, com peso e idade fora dos limites de

comercialização como carne fresca com marcas de Denominação de Origem Protegida (DOP) ou Indicação Geográfica Protegida (IGP).

No âmbito deste projeto, os principais objetivos do presente estudo foram a caracterização da microbiota dos vários tipos de produtos em desenvolvimento, em particular a identificação de fungos produtores de OTA, e a deteção e quantificação de OTA nas amostras em estudo.

# Capítulo 2



## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Importância dos Produtos Cárneos

Os produtos cárneos ostentam uma enorme variedade de sabores, formas e texturas, devido à diversidade das matérias-primas, dos ingredientes e dos processos de fabrico utilizados. Fazem parte, dos produtos de transformação cárnea, não só os enchidos mas também todas as carnes curadas, como por exemplo, os presuntos e as pás.

Os produtos tradicionais portugueses são produtos únicos que têm origem na região que lhes dá o nome e que têm uma forte ligação com essa mesma região, de tal forma que é possível demonstrar que a qualidade do produto é influenciada, pelas raças animais, solo, vegetação, clima e tecnologia de fabrico.

A produção de alimentos tradicionais, tanto de forma “caseira” como industrial, deverá ser enquadrada segundo as exigências de higiene/salubridade, numa perspetiva de proteção do consumidor.

Este, não só valoriza as propriedades organolépticas e nutricionais dos produtos tradicionais como tem vindo a dar cada vez mais importância à segurança dos alimentos.

Neste contexto, surgiu a adoção de estratégias de valorização comercial dos produtos tradicionais, através da certificação e consequente atribuição das marcas: Denominação de Origem Protegida (DOP), Indicação Geográfica Protegida (IGP) e Especialidade Tradicional Garantida (ETG).

De acordo com as condições de cura, o presunto anteriormente à cura, tem de passar por algumas etapas. Nomeadamente a Salga, um Tratamento depois da Salga, Fumagem/Secagem e por fim, Cura e Envelhecimento.

No processo da Salga, como o nome indica, é utilizado o sal (NaCl), próprio para utilização de produtos alimentares. Este processo tem como principal objetivo a desidratação e conservação do presunto. O presunto é totalmente coberto com sal durante 30 dias. Este tempo pode variar conforme o peso da peça, em ambiente em que a temperatura não ultrapasse, os 9/10 °C e a humidade entre os 70-75%.

No fim da Salga, as peças são retiradas do sal. Esse sal é removido com uma lavagem, efetuada com água, deixando-se durante algum tempo a escorrer. De seguida as peças de presunto são untadas com uma mistura de colorau com azeite de Trás-os-Montes ou banha de porco Bísaro, este processo é feito na sala de corte.

Na etapa seguinte, Fumagem/Secagem, o presunto é colocado num local com condições de se praticar uma fumagem muito suave em lume brando, com lenha seca de carvalho ou castanho. Tem como principal função a fixação do aroma da gordura nas fibras musculares, o que condiciona favoravelmente as características finais do produto, mas isto só acontece em condições de elevada temperatura.

Por fim, vem o processo de Cura e Envelhecimento, que é feito num local com condições de frio e pouca humidade (caves ou câmaras de cura), onde prosseguem os processos bioquímicos e a intervenção benéfica da flora microbiana específica, que em conjunto conferem sabor e aromas particulares ao produto.

Todos estes processos são muito importantes para a obtenção de bons produtos.

## **2.2. Problemas de Segurança Alimentar**

A segurança alimentar é um conjunto de normas de produção, transporte e armazenamento de alimentos apontando determinadas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, dizendo quais dos alimentos são adequados ao consumo humano.

Em relação aos perigos de origem biológica, os bolores são as principais causas de deterioração de produtos cárneos curados (Asefa et al., 2010). Deve-se ter em conta, que existem diversos fatores que levam a esta deterioração de produtos cárneos, como por exemplo: o ar, que transporta os esporos de fungos contaminantes para os produtos cárneos curados (Asefa et al., 2010). Também a qualidade das matérias-primas e fatores físicos (Temperatura e atividade de água, aw) são fatores muito importantes para o crescimento de fungos na superfície destes produtos (Asefa et al., 2010). Por outro lado, as práticas de fabrico podem influenciar, o tipo de fungos que se desenvolvem nestes produtos, nas fases de pré-maturação e amadurecimento (Asefa et al., 2010).

O crescimento de bolores pode pôr em risco a segurança e qualidade dos produtos alimentares, não só pelo efeito de deterioração, mas principalmente pela potencial produção de micotoxinas por eles produzidas. O crescimento de fungos indesejáveis pode pôr em causa a saúde dos consumidores, se estes forem patogénicos ou toxigénicos (Asefa et al., 2010). Estes impactos podem ser minimizados, reduzindo o seu crescimento sobre os produtos em causa, para tal torna-se necessário, uma identificação desses fungos associados aos produtos, as suas fontes e os fatores que influenciam e facilitam o seu crescimento (Asefa et al., 2010).

Os fungos filamentosos, mais conhecidos por bolores, têm elevada prevalência em alimentos de baixo teor de água e/ou elevada porção de lípidos. O seu risco está na produção de micotoxinas por algumas espécies.

### **2.3. Micotoxinas**

Etimologicamente o termo Micotoxina combina a palavra grega “Mykes” que significa fungo com o termo do latim, “toxicum” que quer dizer, veneno (toxina) (Benett & Klich, 2003).

As micotoxinas, são compostos biológicos naturais com baixo peso molecular, geralmente tóxicos em baixas concentrações. São produzidas por fungos, em particular pelos géneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. A estrutura química das micotoxinas, varia consideravelmente.

Segundo Pitt (1996), uma outra definição para micotoxinas é sendo “metabolitos fúngicos cuja ingestão, inalação ou absorção cutânea reduz a atividade, causa enfermidades ou mesmo a morte de animais (incluindo as aves) e seres humanos”. As micotoxinas conseguem contaminar uma grande variedade de produtos alimentares, essencialmente agrícolas. Em alguns casos, podem ser muito problemáticas para a saúde humana e dos animais, isto pode resultar de consequências a nível sanitário, económico e de natureza social.

Algumas micotoxinas podem ser problemáticas em animais e seres humanos, podendo afetar principalmente o fígado, rins e o sistema nervoso endócrino e imunitário, pelo que são encaradas como carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas e/ou com atividade imunossupressora.

As ocratoxinas são um dos principais grupos de micotoxinas presentes nos alimentos, não só pela sua ocorrência, mas também pelo alto grau de toxicidade que apresentam sobre os animais.

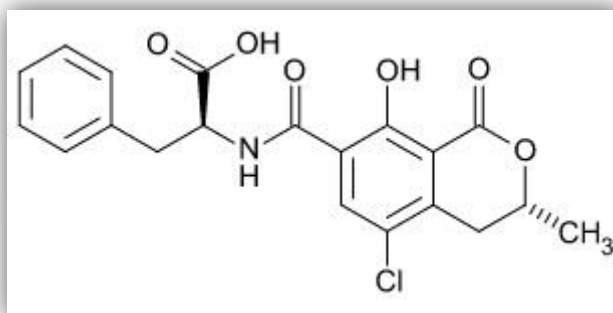
#### **2.3.1. Ocratoxina A**

A Ocratoxina A (OTA) tem suscitado muito interesse, a nível nacional e internacional devido à sua elevada toxicidade e ocorrência. Ela pode ser encontrada em diversos alimentos (cereais, enchidos) e bebidas (café, cerveja), o que pode levar a dificultar a comercialização dos produtos entre países.



O grupo das ocratoxinas divide-se em: Ocratoxina A, Ocratoxina B e Ocratoxina C. A OTA apresenta fluorescência verde, e na sua fórmula apresenta um átomo de cloro (radical R1) que é responsável pelo caráter tóxico. A Ocratoxina B, tem uma fluorescência azul e não apresenta toxicidade pelo motivo de estar desprovida do átomo de cloro. Em relação à Ocratoxina C, com fluorescência verde, constitui um etil éter da OTA, sendo muito menos tóxica que a OTA (Scussel, 1998).

Segundo Nunes (2008), a OTA ostenta alta solubilidade em solventes orgânicos polares e solubilidade moderada em solução aquosa de bicarbonato de sódio. A sua estrutura é um derivado diidro-isocumarínico ligado através de seu grupo 7- carboxílico à L-β-fenilalanina por um grupo amida (Ringot et al., 2006).



**Figura 1:** Estrutura da Ocratoxina A (OTA).

A OTA tem também uma importante característica em relação à estabilidade térmica e à resistência ao tratamento térmico. A remoção das ocratoxinas em alimentos ou em bebidas torna-se muito difícil, recorrendo-se então a uma forma de proteção/prevenção, acerca destas toxinas (Kruger, 2006)

A OTA é uma nefrotoxina que tem ação teratogénica e mutagénica, sendo o seu principal alvo o fígado (Soares, 1997). Em humanos, esta toxina provoca também doenças degenerativas da função renal (Soares, 1997). Esta é caracterizada pela redução progressiva das funções renais, provocando também tumores no trato urinário e danos nos rins.

Esta toxina tem sido encontrada em muitos animais, nos seus tecidos musculares, rins e gordura de porco, e nos músculos e ovos de frangos. Nos suínos com exposição a esta toxina, ocorre o aumento dos rins e alteração de cor, ocorrendo também perda de peso (Scussel, 1998; Taniwaki & Silva, 2001; Jobim et al., 2001).

É importante salientar que as absorções de OTA são maiores em pH ácido (Jobim et al., 2001).

Freire et al. (2007) mencionaram que algumas quantidades de OTA podem suportar o processamento e o metabolismo em suínos, mas é muito pouco provável que esta possa ser detetada no leite ou em carne bovina. Podendo então, afetar a proteção natural do organismo, em que os danos causados por esta toxina possam ser cumulativa estando ligado ao período silencioso da doença, que pode ser longo, até ao aparecimento dos sintomas, de uma forma repentina (Kruger, 2006).

A ocorrência da OTA em produtos agrícolas tem sido muito estudada, como por exemplo nos cereais e seus derivados. Nos produtos de origem animal também podem contribuir para o consumo humano de OTA. Neste caso, esta toxina pode ocorrer nos produtos de origem animal por três vias: (1) a carne pode apresentar contaminação por exposição dos animais a rações contaminadas, pois os cereais são o principal alimento com contaminações de OTA; (2) os produtos derivados podem sofrer contaminação direta através do desenvolvimento natural de fungos ocratoxigénicos durante o processo de cura; (3) os produtos podem sofrer contaminação através dos condimentos usados (Pietri et. al., 2006; Dall'Asta et. al., 2010).

De todos os animais de quinta, o porco é o mais sensível a esta toxina (OTA), pois ela é absorvida e acumulada no sangue, fígado, rim e músculo. Em relação aos ruminantes, a OTA é degradada no rúmen (Pietri et. al., 2006).

### **2.3.2. Fungos que Produzem Ocratoxina A**

A produção de OTA pode ser detetada em várias espécies do género *Aspergillus*, como por exemplo, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus/westerdijkiae* (Bennett and Klich, 2003). Para além dos *Aspergillus*, os *Penicillium* também podem implicar na produção de OTA, nomeadamente *Penicillium verrucosum*, principalmente em cereais, e *Penicillium nordicum*, em produtos cárneos (Chiavaro et. al., 2002; Iacumin et. al., 2009; Dall'Asta et. al., 2010).

Esta produção de Ocratoxina A é devida ao substrato no qual os fungos crescem: o nível de humidade, temperatura e presença de microflora competitiva interagem para influenciar o nível de toxina produzida (Bennett & Klich, 2003).

### 2.3.3. Contaminação de produtos cárneos com OTA

Atualmente a OTA tem sido amplamente estudada em produtos cárneos, principalmente em porcos, pois são muito sensíveis a esta toxina. A OTA é absorvida e acumulada por estes animais no seu sangue, fígado, rim e músculo (Pietri et. al., 2006).

Segundo o estudo de Rodríguez et al. (2012), em 20 amostras de presunto 10 estavam contaminadas com OTA, com valores acima de 2,0 µg/kg na camada superficial. 50% das amostras estavam contaminadas com esta toxina com valores compreendidos entre 2 µg/kg e 160,9 µg/kg. Mas ainda, 3 amostras das 10 positivas apresentam também contaminação de OTA na camada interna com valores acima dos 2,0 µg/kg, o que leva a concluir, que esta toxina se penetra nos tecidos internos dos presuntos (Rodríguez et al. 2012).

Toscani et al. (2007) relatam que em 5 amostras de presunto curado, 3 estavam contaminados com OTA com valores entre 0,11 µg/kg e 7,28 µg/kg em camada superficial, 60% de amostras contaminadas. Na camada interna apenas 40% das amostras (2 amostras) estavam contaminadas com esta toxina (0,28 µg/kg e 1,52 µg/kg). Matrella et al. (2006) estudaram em músculos de porcos abatidos em Itália, que estava presente OTA à superfície com valores médios de 0,024 µg/kg e máximos de 0,9 µg/kg.

# Capítulo 3



### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Plano de Amostragem**

Neste estudo foram analisadas 91 amostras, sendo que 77 eram amostras de presunto de suíno e 14 de presunto de caprino. No caso dos presuntos de suíno, as amostras foram recolhidas em diferentes tempos de cura, com o objetivo de estudar a evolução da contaminação com OTA ao longo deste processo. As amostras analisadas, assim como os tempos de cura correspondentes, estão apresentados no Quadro 1 e 2.

**Quadro 1:** Lista de amostras de presunto de caprino, analisadas no presente estudo e suas características.

<b>Lote</b>	<b>Matéria-Prima</b>	<b>Código</b>	<b>Cura (meses)</b>
EE	Caprino	PREC8EE	3
EE	Caprino	PREC9EE	3
EE	Caprino	PREC10EE	3
EE	Caprino	PREC11EE	3
EE	Caprino	PREC12EE	3
EE	Caprino	PREC13EE	3
EE	Caprino	PREC14EE	3
EE	Caprino	PREC15EE	3
EE	Caprino	PREC17EE	3
EE	Caprino	PREC18EE	3
EE	Caprino	PREC19EE	3
EE	Caprino	PREC20EE	3
EE	Caprino	PREC21EE	3
EE	Caprino	PREC22EE	3

**Quadro 2:** Lista de amostras analisadas no presente estudo e suas características.

Lote	Matéria-Prima	Amostras Código	1ª Colheita	2ª Colheita
			Cura (meses)	Cura (meses)
A	Suíno	PRES12A	20	-
A	Suíno	PRES14A	20	-
A	Suíno	PRES15A	20	-
A	Suíno	PRES16A	20	-
A	Suíno	PRES17A	20	-
A	Suíno	PRES14Ai	23	-
A	Suíno	PRES15Ai	23	-
A	Suíno	PRES16Ai	23	-
B	Suíno	PRES1B	20	-
B	Suíno	PRES2B	20	-
B	Suíno	PRES3B	20	-
B	Suíno	PRES4B	20	-
B	Suíno	PRES5B	20	-
B	Suíno	PRES6B	20	-
B	Suíno	PRES7B	20	-
B	Suíno	PRES8B	20	-
B	Suíno	PRES2Bi	23	-
B	Suíno	PRES3Bi	23	-
B	Suíno	PRES4Bi	23	-
B	Suíno	PRES6Bi	23	-
B	Suíno	PRES7Bi	23	-
C	Suíno	PRES3C	20	-
C	Suíno	PRES6C	20	25
C	Suíno	PRES8C	20	-
C	Suíno	PRES9C	20	25
C	Suíno	PRES11C	20	-
C	Suíno	PRES12C	20	-
C	Suíno	PRES13C	20	-
D	Suíno	PRES12D	19	-
D	Suíno	PRES13D	19	24
D	Suíno	PRES14D	19	24
D	Suíno	PRES15D	19	-
E	Suíno	PRES32E	14	20
E	Suíno	PRES33E	14	-
E	Suíno	PRES34E	14	20
E	Suíno	PRES35E	14	-
E	Suíno	PRES37E	14	20
E	Suíno	PRES38E	14	20
E	Suíno	PRES39E	14	-
E	Suíno	PRES41E	14	-
E	Suíno	PRES48E	20	25
G	Suíno	PRES45G	14	-
G	Suíno	PRES47G	14	-
G	Suíno	PRES50G	14	-
G	Suíno	PRES56G	14	-
G	Suíno	PRES48G	14	-
G	Suíno	PRES49G	14	-
G	Suíno	PRES51G	14	-
G	Suíno	PRES52G	14	-
G	Suíno	PRES54G	14	-
G	Suíno	PRES55G	14	-
G	Suíno	PRES57G	14	-
G	Suíno	PRES58G	14	-
G	Suíno	PRES59G	14	-
H	Suíno	PRES3H	13	-
H	Suíno	PRES4H	13	-
H	Suíno	PRES5H	13	-
H	Suíno	PRES6H	13	-
H	Suíno	PRES10H	13	-
H	Suíno	PRES11H	13	-
H	Suíno	PRES12H	13	-

(continua)

**Quadro 2:** Lista de amostras analisadas no presente estudo e suas características (continuação).

Lote	Matéria-Prima	Amostras	1ª Colheita	2ª Colheita
		Código	Cura (meses)	Cura (meses)
I	Suíno	PRES14I	13	-
I	Suíno	PRES15I	13	-
I	Suíno	PRES16I	13	-
I	Suíno	PRES20I	13	-
I	Suíno	PRES21I	13	-
I	Suíno	PRES22I	13	-
I	Suíno	PRES23I	13	-

Durante o tempo de cura, os presuntos estiveram submetidos a condições de temperatura e humidade controladas, 9/10 °C e 70-75% respetivamente. Estes dados foram obtidos pelo Laboratório de Tecnologia e Qualidade da Carça e da Carne da Escola Superior Agrária de Bragança.

Foram colhidos cerca de 100 g de amostra de cada presunto para um saco estéril. As amostras foram transportadas de imediato para o Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança e imediatamente refrigeradas. Sempre que possível, a análise de fungos foi efetuada imediatamente após a receção das amostras. Nos casos em que não foi possível a análise imediata, as amostras foram conservadas por refrigeração durante um máximo de 3 dias.

### **3.2. Pesquisa de fungos**

A análise de fungos nas amostras constou de isolamento, identificação e quantificação de ocorrência de todos os bolores pertencentes aos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, com especial incidência nos produtores de OTA. Os métodos usados encontram-se a seguir descritos.

#### **3.2.1. Condições de Segurança**

Como os fungos são organismos que se reproduzem muito e rapidamente através de esporos com elevada capacidade de disseminação pelo ar, foram tomados alguns cuidados de segurança.



Para evitar contaminações do trabalho, e principalmente para evitar a contaminação do manipulador e do ambiente laboratorial com esporos fúngicos, todo o trabalho foi efetuado em condições de assepsia, isto é, próximo da chama do bico de Bunsen ou, sempre que considerado necessário, em câmara de segurança biológica tipo AII.

### **3.2.2. Isolamento e identificação de bolores**

#### **3.2.2.1 Sementeira**

A sementeira dos bolores presentes nas amostras foi efetuada pelo método da zaragatoa. Para tal, humedeceu-se a zaragatoa numa solução estéril de glicerol a 20% e em seguida passou-se a zaragatoa na superfície do presunto (evitando a gordura), com o objetivo de recolher uma variedade significativa de bolores. A zaragatoa foi posteriormente usada para fazer um estriamento em placas de Petri de 90 cm de diâmetro contendo aproximadamente 15 mL dos meios de cultura DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramfenicol, OXOID) e DG18 (Dichloran Glycerol 18%, MERCK).

As placas semeadas foram incubadas a 25 °C durante 7 dias, no escuro, em posição normal. O desenvolvimento dos bolores foi observado ao longo deste período, para evitar o crescimento excessivo das colónias.

#### **3.2.2.2 Isolamento e conservação**

Após o período de incubação, os bolores foram observados a olho nu ou à lupa e foi selecionada uma colónia de cada tipo de fungo. O isolamento das colónias selecionadas para posterior identificação foi efetuado através da transferência, à lupa e com uma agulha de inoculação, de uma pequena porção de esporos para uma placa de Petri de 6 cm de diâmetro contendo meio de cultura MEA (Malt Extract Agar, HIMEDIA). Os fungos isolados foram incubados a 25 °C durante 5 a 7 dias, no escuro, em posição normal.

A repicagem foi feita com uma lupa para não transferir organismos indesejados, como por exemplo leveduras, este utensílio torna mais fácil a repicagem.

Os bolores isolados foram conservados por congelação a -80 °C em solução de glicerol 20% com 0,05% Tween80, para posterior análise.

### 3.2.2.3 Identificação dos fungos isolados

#### Identificação Fenotípica

A identificação fenotípica dos bolores isolados de alimentos consiste geralmente da conjugação de dois tipos de características: características morfológicas e características metabólicas.

Na identificação morfológica foram observadas as seguintes características macromorfológicas: dimensão da colónia, cor da colónia no obverso e reverso, cor dos conídios e produção de exsudado. As características micromorfológicas observadas foram: estrutura conidiogénica (conidióforo), e forma e dimensão dos conídios. As preparações para observação ao microscópio foram feitas numa gota de azul de algodão, entre lâmina e lamela. Na realização das preparações usou-se também uma gota de álcool etílico a 98%, para a dispersão dos esporos.

A identificação morfológica foi feita em meio de cultura MEA, após incubação a 25 °C durante 7 dias, e baseou-se em guias de identificação específicos para os géneros em causa (Klich, 2002; Samson et al, 2004; Samson & Frisvad, 2004; Pitt & Hocking, 2009).

A caracterização metabólica está relacionada com o perfil de metabolitos secundários (principalmente micotoxinas) que o fungo produz. Uma vez o presente estudo se debruça sobre a análise de OTA, procedeu-se nesta fase apenas à análise da capacidade ocratoxigénica dos fungos. Para esse efeito, efetuou-se o seguinte procedimento:

Os fungos foram inoculados em placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 15 mL de meio de cultura indutor da produção de OTA – meio YES (extrato de levedura 20 g/L, sacarose 150 g/L, agar 15 g/L) – e incubados a 25 °C durante 7 dias. No final do período de incubação, foram cortadas, com a ajuda de um fura-rolhas, 3 porções de fungo e agar da placa de Petri e mergulhadas em tubos *eppendorf* com 1 mL de metanol, durante 60 minutos, com agitação ocasional. O extrato metanólico contendo as micotoxinas foi analisado por Cromatografia de Camada Fina (TLC). A técnica de TLC é uma técnica simples e pouco dispendiosa frequentemente utilizada para esta análise.

A análise das micotoxinas foi efetuada da seguinte forma: numa folha de sílica de 21 cm x 21 cm, traçamos uma reta a 2 cm da base. Sobre essa reta marcamos as amostras, com espaços entre elas de cerca de 1,5 cm. Como forma de identificar a

ocorrência de OTA, foi utilizada uma solução padrão desta micotoxina como controle. Após a marcação das amostras, colocámos com a ajuda de uma micropipeta 10 µL de cada amostra e 20 µL do padrão de OTA (100 ng/mL). Deixou-se secar as amostras e repetiu-se o procedimento, para aumentar a capacidade de deteção da micotoxina.

Por fim, mergulhou-se a folha de sílica na solução eluente (tolueno : etilacetato : ácido fórmico a 90%; 5:4:1 v/v/v), e deixou-se a correr cerca de 1 hora. No final da corrida, deixou-se evaporar o eluente da folha de sílica na câmara de fumos e observou-se sob radiação ultra-violeta longa (365 nm), necessária para revelar algumas das micotoxinas mais significativas (aflatoxinas, OTA, citrinina, patulina). É muito importante efetuar esta etapa num local escuro, pois as micotoxinas são em geral sensíveis à luz, e deixar que o solvente evapore totalmente, para que não haja perigo de inalação dos fumos tóxicos libertados pelo solvente.

### **Identificação Molecular**

Os bolores dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* cuja identificação fenotípica não foi conclusiva foram submetidos a identificação molecular, através de amplificação e sequenciação de diferentes porções do genoma dos fungos, dependendo do tipo de fungo em estudo. Foram para este efeito amplificadas as seguintes regiões do DNA: região ITS, gene da calmodulina ou gene da β-tubulina.

A extração de DNA dos fungos filamentosos e amplificação das sequências por PCR, foram realizadas pelo método “REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit”, conforme o protocolo descrito pelo fabricante.

A extração de DNA genómico foi efetuada homogeneizando uma porção de esporos e micélio em 50 µL de Tampão de Extração do kit referido e aquecido a 95 °C durante 10 minutos. Segundo as indicações do fabricante, o DNA assim extraído pode ser utilizado diretamente para a reação de amplificação, sem necessidade de purificações subsequentes. No entanto, previamente à reação de PCR, a qualidade e concentração do DNA genómico extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. A corrida eletroforética foi realizada a 80V durante 40 minutos, no mesmo tampão. O gel foi corado com 3 µL de SafeView por cada 50 mL de gel, por fim foi visualizado à luz UV (254 nm) e fotografado no equipamento de análise de imagem EagleEye.

Uma vez confirmada a qualidade do DNA, as reações de amplificação foram realizadas usando a mistura de PCR pré-preparada do kit (solução ReadyMix), para um

volume final de 25 µL. Os primers usados e correspondentes programas de PCR encontram-se descritos nos Quadros 3 e 4.

**Quadro 3:** Pares de *primers* usados neste estudo, e respectivos detalhes.

Gene	Pares de primers	Sequência do primer	Tamanho do produto de PCR (pb)	Referência
Calmodulina	CL1	GARTWCAAGGAGGCCTTCTC	730	O'Donnell et al., 2000
	CL2A	TTTTGCATCATGAGTTGGAC		
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	600	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
β-tubulina	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	450	Glass & Donaldson, 1995
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC		

**Quadro 4:** Programas de PCR utilizados para cada par de *primers*.

Programa de amplificação	ITS1/ITS4	CI1/CI2A	Bt2a/Bt2b
Desnaturação inicial	95 °C, 3 min	95 °C, 10 min	94 °C, 3 min
Desnaturação	95 °C, 30 seg	95 °C, 50 sec	94 °C, 30 sec
Emparelhamento	55 °C, 30 seg	35x 55 °C, 50 sec	35x 61 °C, 30 sec
Extensão	72 °C, 2 min	72 °C, 1 min	72 °C, 2 min
Extensão final	72 °C, 7 min	72 °C, 7 min	72 °C, 7 min
<b>Referência</b>	White et al., 1990	O'Donnell et al., 2000	Glass & Donaldson, 1995

Os géis para confirmação dos produtos de PCR foram preparados conforme descrito anteriormente, com a diferença na concentração de agarose, que neste caso foi de 1,2%. Foi utilizado o marcador de tamanho molecular 100 bp Ladder (Promega).

Os produtos de PCR foram purificados usando o *kit* GF-1 PCR cleanup (Vivantis), seguindo as instruções do fabricante, e enviados para sequenciação. As sequências obtidas foram os produtos de PCR, foram purificados antes de serem sequenciados. As sequências foram otimizadas usando os programas Sequencher 4.9 Demo e BioEdit.

As sequências otimizadas foram comparadas com as bases de dados disponíveis, nomeadamente com as bases de dados GenBank (URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e CBS (URL: <http://www.cbs.knaw.nl/Aspergillus/Biolomics.aspx?Table=Aspergillus+and+Penicillium+Species>), através do programa de comparação de sequências BLAST.

### 3.3. Detecção e quantificação de OTA nas amostras

#### 3.3.1. Reagentes e Materiais

A solução padrão OTA utilizada (Sigma) continha uma concentração de 4 µg/mL, desta concentração foram preparadas para cada dia soluções de trabalho com uma concentração de 100 ng/mL.

Foram utilizados solventes para HPLC (acetonitrilo, clorofórmio e metanol) para a extração das amostras e preparação da fase móvel. A purificação dos extratos foi feita com a ajuda de colunas de imunoafinidade (IAC) OchraTest WB da VICAM (Watertown, MA, EUA).

O Tampão Fosfato Salino adicionado de 0,05% (p/v) de Tween 80 (PBS-T) foi a solução de lavagem utilizada durante a purificação dos extratos. Para esta solução preparou-se uma solução *stock* com concentração 10x da seguinte maneira: 8 g de NaCl, 1,2 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g de KCl, pH 7 para 100 mL. Por fim a partir desta solução (*stock*) preparou-se a solução final de lavagem (PBS-T 1x).

#### 3.3.2. Condições de Segurança

Nesta etapa torna-se necessário ter alguns cuidados devido à elevada toxicidade das OTA para se poder manusear de forma segura esta substância. Utilizou-se equipamentos de proteção nomeadamente bata e luvas de nitrilo. Quanto ao material reutilizável tiveram de ser descontaminados, por imersão em lixívia a 10%, durante 24 horas, em relação ao material descartável, como as colunas de imunoafinidade, foram descontaminados no autoclave e só depois é que se pode descartá-los.

#### 3.3.3. Preparação da Amostra

A análise de OTA foi efetuada em todas as amostras recebidas. As amostras foram preparadas da seguinte forma: foi cortada uma camada longitudinal superficial, com cerca de 2 cm de profundidade, picada finamente e congelada a -20 °C até ser analisada para presença de OTA.

#### **3.3.4. Extração de OTA**

O método de extração de OTA usado no presente estudo seguiu o método anteriormente testado e validado no Laboratório de Microbiologia e descrito em Silva (2013). Foram pesados 10 g de amostra picada para um matraz de 250 mL e adicionados 40 mL de metanol acidificado com bicarbonato de sódio a 1% (v/v).

A amostra foi levada à agitação mecânica durante 1 hora para iniciar a extração. Passado 1 hora, filtrou-se o extrato metanólico com filtro de papel e mediu-se 10 mL de substrato. Diluiu-se com 40 mL de PBS-T, e voltou-se a filtrar com filtro de fibra de vidro.

Em seguida, passou-se 20 mL do substrato anterior por uma IAC OchraTest WB. A coluna foi posteriormente lavada com 10 mL de PBS-T e depois com 10 mL de água destilada. A OTA foi eluída das colunas de imunoafinidade através da passagem de 2 mL de metanol e recolhida para um frasco de cor âmbar.

#### **3.3.5. Detecção e Quantificação por HPLC**

A OTA foi detetada e quantificada no Laboratório de Ciência e Tecnologia Alimentar do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho por um sistema de HPLC de fase reversa com um detetor de fluorescência. Este sistema está equipado com um amostrador automático (Spark Basic Marathon), uma bomba (Varian 9002), uma coluna C18 de fase reversa Chromolith Performance RP-18e (4,6 mm x 100 mm, poro de 2 µm; Merck), equipado com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária, e um detetor de fluorescência (Jasco FP-920).

A fase móvel para OTA consistiu um programa isocrático de água : acetonitrilo : ácido acético (99:99:02, v/v/v) e foi bombeada a 0,6 mL/min durante um tempo total de execução de 7 minutos. O volume de injeção foi 20 µL. A deteção foi realizada a um comprimentos de onda de excitação e de emissão de 365 nm e 435 nm, respetivamente. O ganho foi definido para 1000 e a atenuação a 16.

O controlo da instrumentação, a aquisição e o processamento de dados, foram obtidos com o software Varian 850-MIB Data System Interface. Consideraram-se amostras positivas quando se originou um pico, no tempo de retenção similar ao de cada padrão, com uma altura de cinco vezes mais elevado do que o ruído da linha de base.

A quantificação da OTA nas amostras foi feita por comparação com uma reta de calibração anteriormente obtida. Os parâmetros de calibração para OTA foram os

seguintes: Curva de calibração  $y = 0,0001x - 0,1668$ ,  $R^2 = 0,9985$ ; limite de deteção 0,51 ng/mL; limite de quantificação 2,1 ng/mL.

Uma vez que a micotoxina extraída foi eluída em 2 mL de metanol em vez de 1 mL, as concentrações de OTA calculadas a partir da curva de calibração (em ng/mL) foram multiplicadas por 2 para se obter a quantidade de micotoxina na amostra (em ng/g ou  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

# Capítulo 4





## 4. Resultados

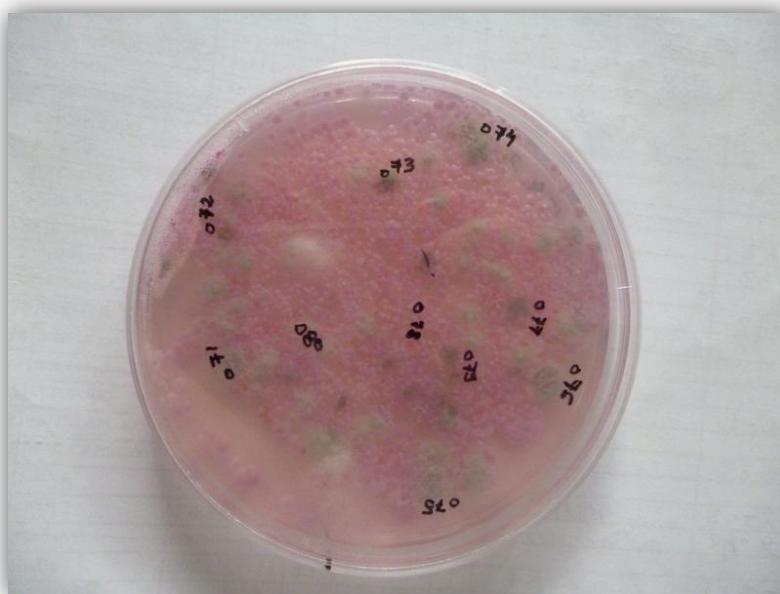
### 4.1. Micobiota dos presuntos

Esta secção descreve os resultados obtidos na monitorização dos fungos nas amostras recolhidas, em termos da sua identificação e prevalência. De cada amostra, foi isolado um fungo representativo de cada tipo, para determinar a sua prevalência. Apenas os géneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram considerados, uma vez que os fungos produtores de micotoxinas, nomeadamente OTA, nas matrizes em estudo pertencem a estes géneros.

#### 4.1.1. Isolamento e identificação de fungos

Das amostras analisadas foram isolados 544 fungos. De entre estes, foram identificados 40 *Aspergillus* (34 morfologicamente e 6 molecularmente) e 132 *Penicillium* (41 morfologicamente e 91 molecularmente).

A Figura 2 dá-nos o exemplo de uma placa de DRBC semeada com uma amostra e usada para posterior isolamento dos fungos.

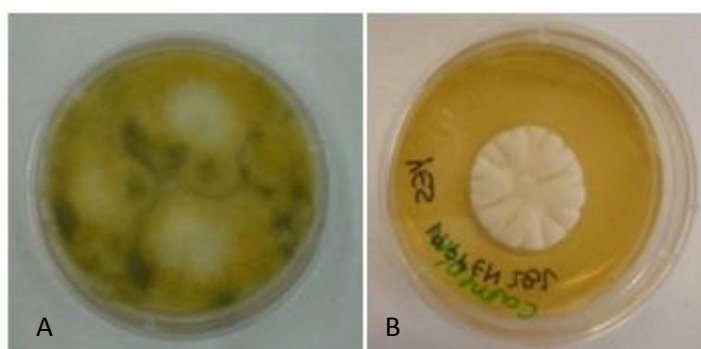


**Figura 2:** Placa de DRBC onde os fungos foram semeados.

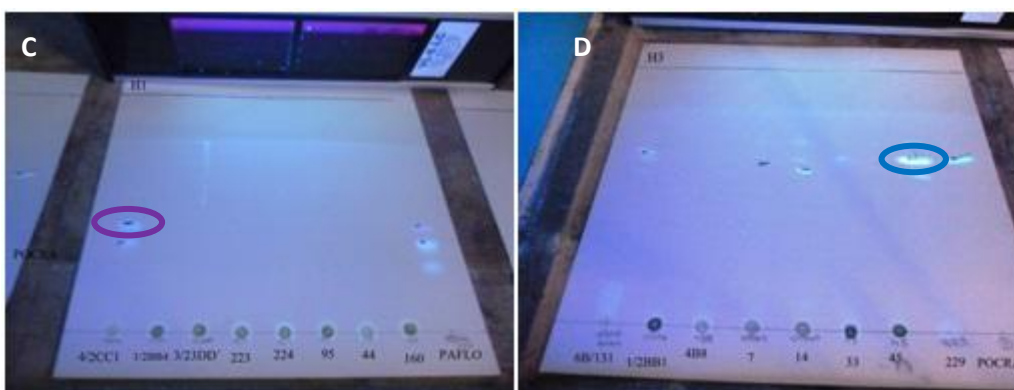
#### 4.1.1.1. Identificação fenotípica

A identificação morfológica ao nível da espécie nos géneros em estudo é muito complexa e difícil de obter, pois existe um elevado grau de similaridade morfológica entre espécies geneticamente próximas mas distintas.

A Figura 3 exemplifica dois fungos em meio YES para identificação morfológica e determinação do perfil toxigénico. Na Figura 4, mostra-nos um exemplo para deteção de perfil toxigénico pelos fungos por TLC. A fluorescência violeta corresponde à Aflatoxina e a fluorescência azul à OTA.



**Figura 3:** Exemplo de fungos em meio YES para identificação morfológica e determinação do perfil toxigénico.  
A- *Aspergillus flavus*, B- *Penicillium nordicum*.



**Figura 4:** Exemplo de uma placa de TLC para determinação do perfil toxigénico.  
C- Para Aflatoxinas, D- Para OTA

#### 4.1.1.2. Identificação Molecular de Fungos Filamentosos

Para identificação molecular, foram inicialmente testados primers para amplificação de 3 regiões distintas do genoma: ITS, gene da calmodulina e gene da  $\beta$ -tubulina. Apesar de os genes da calmodulina e da  $\beta$ -tubulina serem geneticamente mais informativos, a sua amplificação é também mais difícil. Nesse sentido, sempre que não foi conseguida amplificação para estes genes, foi usada a região ITS para identificação molecular. A Figura 5 exemplifica um resultado obtido para a amplificação da região ITS.



**Figura 5:** Gel de agarose a 1,2% com o resultado da amplificação da região ITS para alguns fungos em estudo. M: marcador de peso molecular 100 bp Ladder (Promega); Poços 1 a 19: amostras de fungos; Poços 8, 10, 14, 16 e 19: sem amplificação.

No Quadro 5, estão apresentados alguns exemplos de fungos que foram identificados molecularmente.

**Quadro 5:** Exemplos de alguns resultados da Sequenciação.

Código	Identificação	Similaridade
6B/131	<i>A. westerdijkiae</i>	99%
13PASP171	<i>A. flavus</i>	98%
17PPEN78	<i>P. echinulatum</i>	98%
13PPEN26	<i>P. solitum</i>	100%
14PPEN285	<i>P. nordicum</i>	100%
14ppen281	<i>P. brevicompactum</i>	100%
14PPEN282	<i>P. nordicum</i>	99%
14PPEN274	<i>P. solitum</i>	99%
14PASP236	<i>A. pseudoglaucus</i>	99%
14PPEN275	<i>P. commune</i>	99%
14PASP270	<i>A. proliferans</i>	99%
14PPEN279	<i>P. brevicompactum</i>	99%

A percentagem de similaridade, fornece-nos a identidade máxima obtida por um HSP (High-scoring segment pairs), isto é, quanto maior for a percentagem de identidade entre a nossa sequência e as sequências existentes na base de dados, maior é o grau de confiança na identificação obtida. Para os géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, e para as sequências em causa, o limite mínimo de similaridade a partir do qual devemos considerar a identificação correta ao nível da espécie é de 97%.

#### 4.2. Prevalência dos bolores nas amostras de presunto de caprino e presunto de suíno.

Após obtida a identidade dos fungos isolados, foi calculada a prevalência de cada uma das espécies para os vários tipos de matriz e para os diferentes tempos de cura.

De acordo com os resultados apresentados no Quadro 6, em relação a *A. flavus*, esta prevalência é distribuída pelas amostras de presunto de caprino (50%) e suíno (31%). Por outro lado a espécie *P. commune* apresenta percentagens em presuntos de caprino de 25% e em presuntos de suíno com uma percentagem mais elevada, 60%.

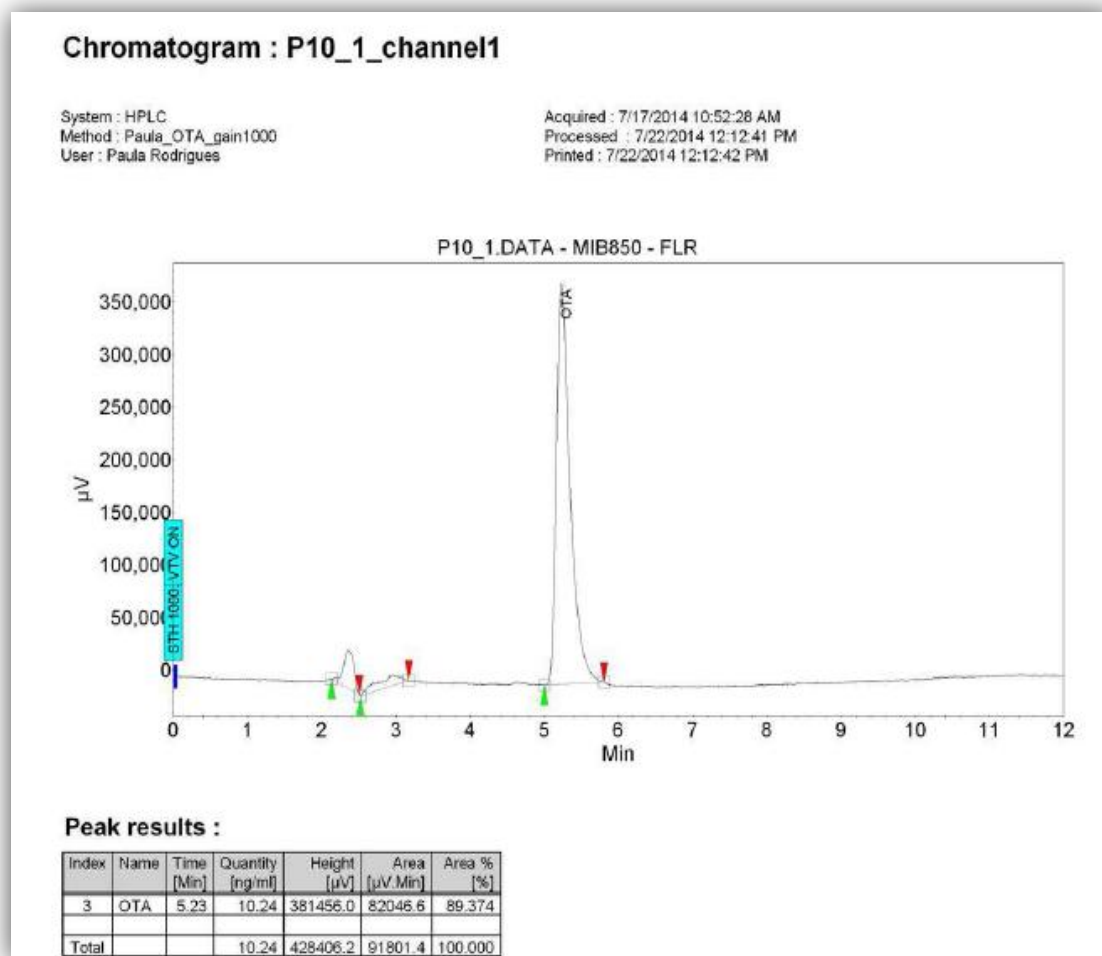
Os bolores que apresentaram uma menor incidência nas amostras foram: *A. westerdijkiae* (3%), *P. crustosum* (5%), *P. echinulatum* (5%), *P. solitum* (5%) e *P. viridicatum* (5%), em que todos estes fungos são de amostras de presunto de suíno.

**Quadro 6:** Prevalência (em percentagem) de bolores, por espécie, nas amostras de presunto de caprino e suíno.

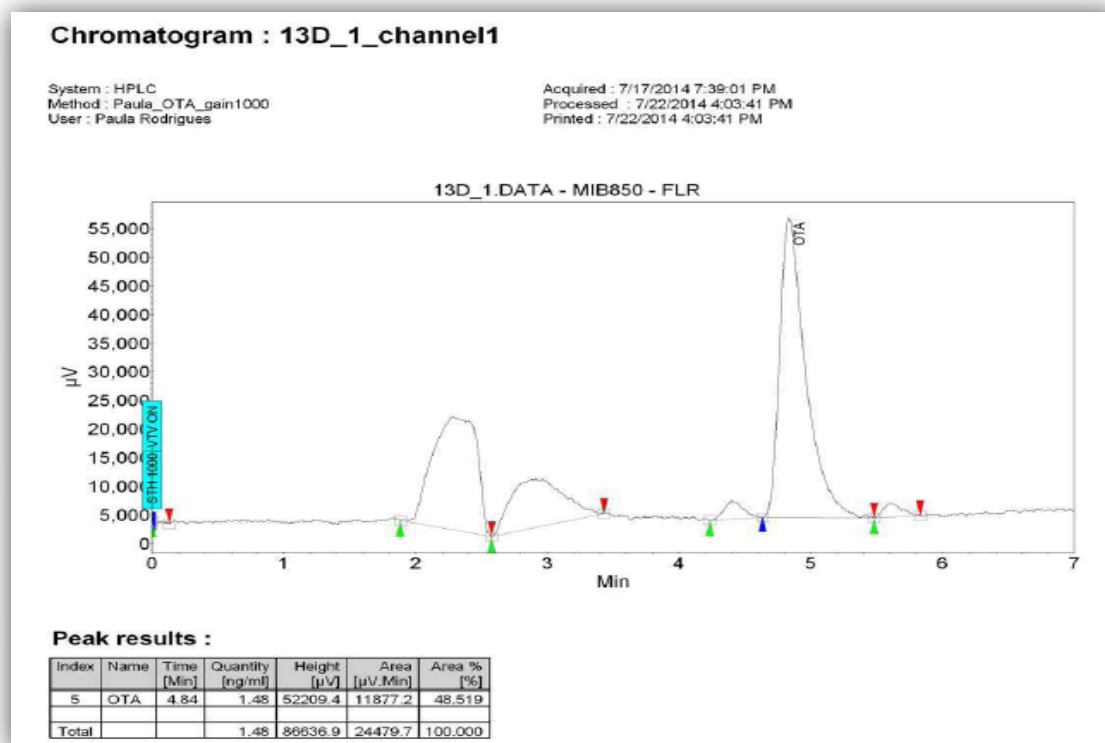
Lista de espécies	Caprino	Suíno
<i>A. flavus</i>	50%	31%
<i>A. parasiticus</i>	50%	-
<i>A. westerdijkiae</i>	-	3%
<i>A. coprobium</i>	-	20%
<i>P. commune</i>	25%	60%
<i>P. echinulatum</i>	-	5%
<i>P. solitum</i>	-	5%
<i>P. viridicatum</i>	-	5%
<i>P. nordicum</i>	-	10%
<i>P. cyclopium</i>	25%	-
<i>P. chrysogenum</i>	-	20%
<i>P. crustosum</i>	-	5%

### 4.3. Detecção e Quantificação de OTA nas Amostras

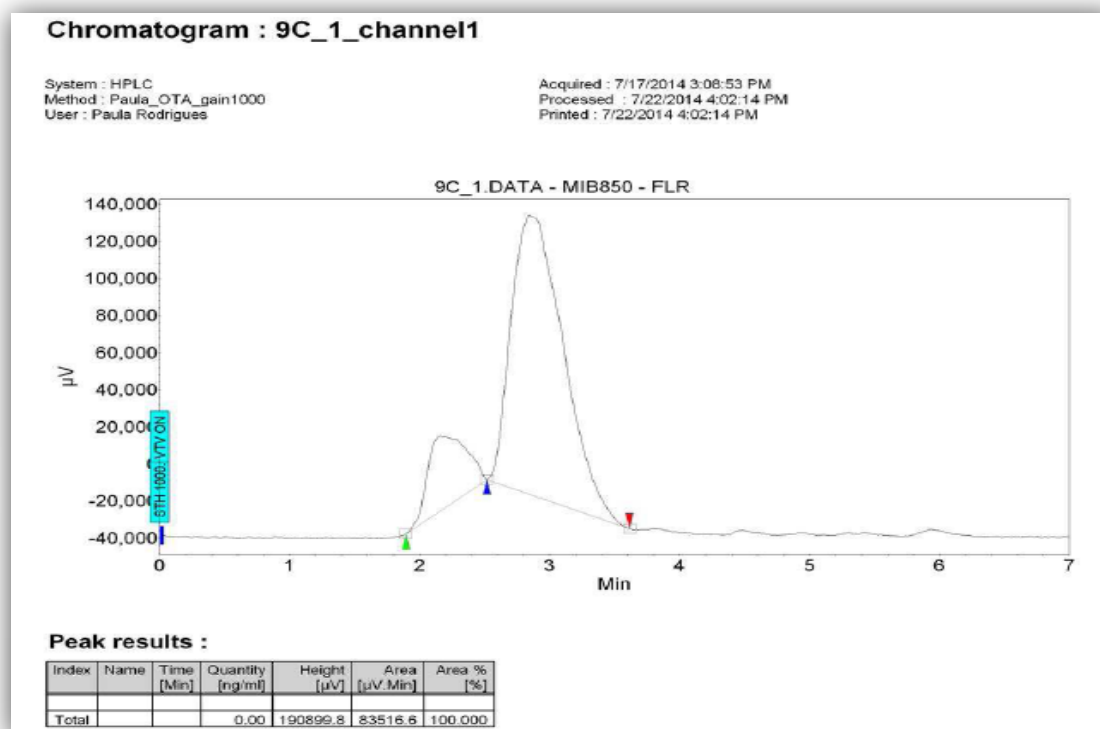
Nesta secção são apresentados os resultados das análises de OTA nas amostras de presunto de suíno e de caprino. As Figuras 6, 7 e 8, exemplificam os cromatogramas obtidos para a solução padrão de OTA, amostra naturalmente contaminada com OTA, e amostra onde não houve detecção de contaminação, respetivamente.



**Figura 6:** Exemplo de cromatograma obtido para solução padrão de OTA 10 ng/mL.



**Figura 7:** Exemplo de cromatograma obtido para uma amostra naturalmente contaminada com OTA.



**Figura 8:** Exemplo de cromatograma obtido para uma amostra onde não foi detetada contaminação com OTA.

Nos Quadros 7 e 8 estão descritos os valores obtidos (média e valores máximo e mínimo) dos resultados de OTA nas amostras de presunto de suíno e caprino. Os resultados por amostra estão apresentados no Anexo 1.

**Quadro 7:** Resumo dos resultados de OTA para os vários tipos de amostras e seus tempos de cura.

Origem	Suíno					Caprino
	1ª colheita			2ª colheita		
Tempo de cura (meses)	<b>13-14</b>	<b>19-20</b>	<b>23</b>	<b>20<sup>a</sup></b>	<b>24-25<sup>b</sup></b>	<b>3</b>
Nº Amostras	35	25	8	4	5	14
Nº Amostras contaminadas (%)	3 (9%)	5 (20%)	2 (25%)	1 (25%)	1 (20%)	-
OTA (µg/kg)						
Média	< LQ	26,67	4,51	3,48	2,22	< LD
mín-máx	-	2,96 - 99,12	2,22 - 7,2	<LD- 3,48	<LD- 2,22	-

<sup>a</sup> 2ª colheita de amostra efetuada em presuntos previamente amostrados com 14 meses de cura; ver Quadro 2.

<sup>b</sup> 2ª colheita de amostra efetuada em presuntos previamente amostrados com 19-20 meses de cura; ver Quadro 2.

**Quadro 8:** Resultados de OTA de mesmas amostras na 1ª e 2ª Colheita.

Amostras	1ª Colheita		2ª Colheita	
	Cura (meses)	OTA (µg/kg)	Cura (meses)	OTA (µg/kg)
PRES6C	20	25,44	25	2,22
PRES9C	20	< LD	25	< LD
PRES13D	19	2,96	24	< LD
PRES14D	19	< LD	24	< LD
PRES32E	14	< LD	20	3,48
PRES34E	14	< LD	20	< LD
PRES37E	14	< LD	20	< LD
PRES38E	14	< LD	20	< LD
PRES48E	20	-	25	< LD



O Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão Europeia, que fixa os teores de certos contaminantes em géneros alimentícios, apenas estabelece limites para produtos de origem vegetal, não existindo qualquer limite de OTA para produtos cárneos e derivados. Os valores limite existentes para produtos de consumo direto variam entre 2 µg/kg e 10 µg/kg (se excluirmos os produtos dirigidos a lactentes).

De entre as amostras analisadas, 15 apresentaram contaminação com OTA, todas são amostras de presunto de suíno. Se tomarmos como referência os valores limite para produtos de consumo direto entre 2 µg/kg e 10 µg/kg, definidos pelo Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão Europeia para outros produtos alimentares, três amostras apresentaam níveis de contaminação acima de 10 µg/kg: as amostras PRES6C com 25,44 µg/kg, PRES16A com 25,86 µg/kg e PRES6B com 99,12 µg/kg.

Consoante os resultados obtidos da segunda amostragem, nenhuma das amostras atingiu o valor máximo permitido, mas duas amostras tiveram valores significativos, a amostra PRES6C com 2,22 µg/kg e a amostra PRES32E com 3,48 µg/kg.

# Capítulo 5



## 5. Discussão

### 5.1. Bolores

Muitos fungos produtores de toxinas têm um crescimento ótimo a temperaturas próximas dos 25 °C, mas conseguem crescer também e produzir toxinas a temperaturas próximas dos 10 °C. Neste sentido, torna-se muito difícil o controlo fúngico e a consequente produção de OTA nos produtos cárneos em causa.

Os bolores com maior prevalência neste estudo foram *Aspergillus flavus* e *Penicillium commune*. Podendo ser encontrado nas amostras de caprino (50%) e suíno (31%). Em relação ao *P. commune* foi detetado em todas as matrizes, presunto de caprino (em 25% das amostras) e presunto de suíno (60%). Várias espécies de *Penicillium*, nomeadamente *P. commune*, encontram-se com bastante frequência em produtos cárneos curados da Noruega (Filtenborg et al. 1996; Nunez et al. 1996; Peintner et al. 2000; Lopez-Diaz et al. 2001; Sunesen & Stahnke, 2003; Tabuc et al. 2004; Battilani et al. 2007; Papagianni et al. 2007; Sorensen et al. 2008). Em relação a *A. flavus*, também é muito frequente em presuntos. Este facto acontece quando há um aumento da temperatura com o tempo de secagem na sala de processamento, o que vai favorecer o crescimento dos *Aspergillus* particularmente *A. flavus* (Rojas et al. 1991)

Um outro fungo bastante importante e frequente em produtos cárneos curados, é o *P. nordicum*. Apresentou baixa prevalência neste estudo (10%). Neste caso como é um fungo difícil de isolar, mediante as leveduras e outros fungos que estejam no mesmo meio, muitas vezes quando há deteção de OTA é devido ao *P. nordicum* mesmo não o conseguindo isolar. Segundo Battilani (2007), *P. nordicum* está normalmente presente na superfície dos presuntos curados processados em Itália. Outros estudos revelam que este fungo está presente em alimentos ricos em NaCl (Lund & Frisvad, 2003; Rodriguez et al., 2012).

*Aspergillus westerdijkiae*, também um fungo muito importante na produção de OTA, foi encontrado em apenas uma amostra (PRES6B).

Os fungos *Aspergillus* secção *Nigri*, importantes produtores de OTA nos alimentos, não foram isolados nas amostras analisadas. Este resultado era já expectável, uma vez que este grupo de fungos não está adaptado às condições dos produtos de cura (baixa aw e elevada concentração de NaCl).

## 5.2. Detecção e Quantificação de OTA nas amostras.

Das 91 amostras, mais propriamente nas amostras de presunto de suíno, 15 foram detetadas com OTA (16,5%). Três amostras foram detetadas com uma contaminação considerada elevada, com valores que variaram entre 25,44 µg/kg e 99,12 µg/kg, tendo valor médio de 50,14 µg/kg.

Em relação às amostras de presunto de caprino, em nenhuma delas foi detetada contaminação com OTA.

Segundo o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão Europeia, como já foi referido anteriormente, já que não existe um limite de OTA para produtos cárneos e derivados, devemos ter em conta que o consumo direto de certos produtos tem um limite máximo de 10 µg/kg. Verificamos que as amostras PRES6C, PRES16A e PRES6B ultrapassa o nível máximo referido.

Podemos comparar este estudo de contaminação com OTA em produtos cárneos e derivados com estudos anteriores. Toscani et al. (2007) relatam que em 5 amostras de presunto curado, 3 estavam contaminados com OTA com valores entre 0,11 µg/kg e 7,28 µg/kg em camada superficial, correspondendo a 60% de amostras contaminadas. Segundo o estudo de Rodríguez et al. (2012), em 20 amostras de presunto 10 estavam contaminadas com OTA, com valores acima dos 2,0 µg/kg na camada superficial. 50% das amostras estavam contaminadas com esta toxina com valores compreendidos entre 2 µg/kg e 160,9 µg/kg.

Segundo o nosso estudo, pudemos observar que nas amostras de presunto de caprino não ocorreu deteção de OTA, ou seja não houve contaminação por esta toxina. Por outro lado nas amostras de presunto de suíno, foi diagnosticado em diversas amostras teores de OTA bastante elevados. Isto pode ter origem no desenvolvimento de fungos ocratoxigénicos. Como referido anteriormente este crescimento e produção de OTA está relacionado com fatores de humidade, temperatura e presença de microflora competitiva que interagem para influenciar o nível de toxina produzida.

É de salientar que em estudos anteriores (Silva, 2013), em alguns dos presuntos de suíno deste estudo poderiam estar contaminados por OTA, pois na sua origem (carne fresca) já poderia estar contaminada, é o caso das amostras PRES15I e PRES16I, apesar de serem inferiores ao LQ.

De acordo com este estudo, as condições de cura, humidade e temperatura entre 70-75% e 9/10°C respetivamente, vão influenciar o crescimento de fungos ocratoxigénicos. Quanto mais tempo o produto for sujeito às condições de cura mais facilmente

aparecem fungos ocratoxigénicos nas amostras. Relativamente a um tempo de cura superior aos 19 meses, pode implicar que haja ocorrência de OTA nas amostras.

Nas amostras de presunto de suíno, com um tempo de cura entre 13-14 meses, temos valores inferiores ao LQ. Por outro lado nos presuntos de caprino (3 meses de cura), os valores são inferiores ao LD. Segundo Rodríguez et al. (2012) as espécies ocratoxigénicas do género *Penicillium* apresentam um crescimento elevado a humidades e temperaturas de 84%, valores onde neste presente estudo os presuntos estão submetidos a um tempo de cura longo. A amostra PRES6B foi a amostra com maior nível de OTA detetado – 99,12 µg/kg. Nesta mesma amostra foi identificado o fungo ocratoxigénico *A. westerdijkiae* (anteriormente denominado *Aspergillus ochraceus*). Esta é uma das mais importantes espécies de fungos produtoras de OTA, geralmente associada a matrizes vegetais como o arroz, trigo e café, ou a ambientes salinos (lagos, lodos) (Frisvad et al., 2004).

De acordo com os resultados de OTA neste estudo, maioritariamente das amostras contaminadas, são na primeira amostragem. São produzidas toxinas à superfície do presunto logo, quando é feito o corte do produto para análise de toxinas, este produto se estiver contaminado irá ser detetadas as toxinas, sendo difícil conter toxinas na segunda colheita. Na segunda amostragem, algumas amostras apresentaram contaminação por OTA. A amostra PRES32E foi a que teve um valor mais notável porque, como o tempo de cura influencia o desenvolvimento de fungos produtores de toxinas, apesar de não se detetar OTA na primeira amostragem. Desde a primeira até à segunda colheita o tempo de cura foi propício para a produção toxinas.

Na maioria das amostras contaminadas com OTA não foram detetados fungos produtores desta toxina. Este facto pode ser justificado pelo acontecimento de o principal fungo ocratoxigénico dos produtos cárneos, *P. nordicum*, ser de crescimento mais lento e limitado do que a micoflora acompanhante, pelo que se torna difícil a sua deteção aquando da amostragem e isolamento em meio de cultura. No caso das matrizes em causa, a micoflora presente, e em particular as leveduras, é bastante significativa, o que em muitos casos dificulta ou até impossibilita o isolamento dos bolores de crescimento mais lento.

*A. flavus*, um fungo com muita prevalência em amostras de presunto de suíno e caprino, é um fungo produtor de Aflatoxinas, mas só as produz se as amostras estiverem sujeitas a altas temperaturas. Apesar de este fungo ter um crescimento em grandes

concentrações de NaCl (halotolerante) e aw baixas não significa que produzem toxinas. Em estudos anteriores prova que este fungo não produzia Aflatoxinas (Silva, 2013).

# Capítulo 6





## 6. Conclusões

A ocratoxina A é produzida por várias espécies de fungos filamentosos dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Esta toxina pode estar presente em diversos produtos alimentares, tais como, cereais, café, produtos cárneos e seus derivados. Sendo a OTA uma toxina nefrotóxica, torna-se necessário a adoção de medidas que previnam a contaminação, bem como o desenvolvimento de programas de controle para a redução da ingestão desta micotoxina pela população.

De acordo com este estudo os principais fungos produtores desta toxina são *A. westerdijkiae* e *P. nordicum*. Na identificação dos fungos, o *A. westerdijkiae* teve uma prevalência em amostras de presunto de suíno de 3%, prevalência bastante baixa, mas continua a ser um grande fator para ocorrência de OTA em amostras de presunto de suíno. Em relação ao *P. nordicum* houve uma prevalência baixa (10% em amostras de presunto suíno), como já foi referido anteriormente, torna-se difícil a sua deteção aquando da amostragem e isolamento em meio de cultura, o que pode implicar que apesar de não o detetarmos, ele pode estar presente e produzir OTA.

De acordo com as amostras analisadas, as amostras de presunto de suíno apresentam um elevado risco para a saúde do consumidor em termos de contaminação por OTA. É necessário que haja controle ao nível da temperatura e humidade de forma a impedir o desenvolvimento fúngico e respetiva produção da toxina (OTA) durante o processo de cura.

Quanto ao presunto de caprino temos valores muito baixos de OTA ou até mesmo inferior ao LD, não quer dizer que não está contaminada por OTA mas os valores são muito baixos para se detetar OTA nestas amostras. Estes valores, podemos considerá-los que o período de cura mais curto, será menos favorável à acumulação de níveis detetáveis de OTA.

Segundo o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão Europeia, como já foi referido anteriormente, três amostras deste estudo ultrapassaram os valores máximos permitidos pela Comissão Europeia - PRES6B (99,12 µg/kg), PRES16A (25,86µg/kg) e PRES6C (25,44 µg/kg). Naturalmente, estas três amostras apresentam risco para a saúde dos consumidores.



# Capítulo 7



## 7. Referências Bibliográficas

Ancsub. (2005). Caderno de Especificações: Alheira de Vinhais, Indicação Geográfica Protegida.

Asefa, D. T., Kure, C. F., Gjerde, R. O., Omer, M. K., Langsrud, S., Nesbakken, T., & Skaar, I. (2010). Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. *International journal of food microbiology*, 140(2), 131-135.

Asefa, D. T., Gjerde, R. O., Sidhu, M. S., Langsrud, S., Kure, C. F., Nesbakken, T., & Skaar, I. (2009). Moulds contaminants on Norwegian dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 435-439.

Bennett, J.W. & Klich M. (2003). *Mycotoxins. Clinical of Microbiology Reviews* 16.

Cabañes, F. J., Bragulat, M. R., & Castellá, G. (2010). Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins*, 2(5), 1111-1120.

Chiavaro, E., Lepiani, A., Colla, F., Bettoni, P., Pari, E., & Spotti, E. (2002). Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorometric method. *Food Additives & Contaminants*, 19(6), 575-581.

Comi, G., Orlic, S., Redzepovic, S., Urso, R., & Iacumin, L. (2004). Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *International journal of food microbiology*, 96(1), 29-34.

Dall'Asta, C., Galaverna, G., Bertuzzi, T., Moseriti, A., Pietri, A., Dossena, A., & Marchelli, R. (2010). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from porks fed with contaminated diet. *Food chemistry*, 120(4), 978-983.

Duarte, S. C., Lino, C. M., & Pena, A. (2012). Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. *The Veterinary Journal*, 192(3), 286-292.

União Europeia (2006). Regulamento (CE) N. ° 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia L, 364.

Freire, F. D. C. O., Vieira, I. G. P., Guedes, M. I. F., & Mendes, F. N. P. (2007). Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical.

Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraeken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F., & Samson, R. A. (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. Studies in Mycology, 50(1), 23-43.

Gonçalves, E., Pinto, M. M., & Felício, J. D. (2001). Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. O Biológico, 63(1/2), 15-19.

Jobim, C. C.; Gonçalves, G. D.; Santos, G. T. (2001). Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “versus” desempenho animal e qualidade dos seus produtos. Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas. p, 242-261.

Klich, M. A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. American Society for Microbiology.

Kruger, C. D. (2006). Ocratoxina A em suínos abatidos no estado do Rio de Janeiro sob inspeção sanitária, Tese de pós graduação em medicina veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro.

Matrella, R., Monaci, L., Milillo, M. A., Palmisano, F., & Tantillo, M. G. (2006). Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. Food control, 17(2), 114-117.

Nunes, E. O. (2008). População de fungos filamentosos e sua relação com micotoxinas presentes na uva e no vinho de Santa Catarina. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina.

Pietri, A., Bertuzzi, T., Gualla, A., & Piva, G. (2006). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from northern Italy. *Italian journal of food science*, 18(1), 99.

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519). New York: Springer.

Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J., & Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions*, 159(1), 18-46.

Rodrigues, P., Venâncio, A., & Lima, N. (2012). Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. *Food Research International*, 48(1), 76-90.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Delgado, J., & Córdoba, J. J. (2012). Presence of ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in the drying stage. *Meat science*, 92(4), 728-734.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Nuñez, F., & Córdoba, J. J. (2012). Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control*, 27(1), 118-126.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004). *Introduction to food-and airborne fungi* (No. Ed. 7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2004). *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Schmidt-Heydt, M., Graf, E., Stoll, D., & Geisen, R. (2012). The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food microbiology*, 29(2), 233-241.



Scussel, V. M. (1998). Micotoxinas em alimentos (pp. 19-22). Insular.

Soares, L. M. V. (1997). Ocorrência de micotoxinas em alimentos: Situação em São Paulo. Ciência de alimentos avanços e perspectivas, v.2.

Silva, D. R. (2013). Avaliação da qualidade de presuntos de suíno, ovino e caprino relativamente à contaminação por micotoxinas. Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

Toscani, T., Moseriti, A., Dossena, A., Dall'Asta, C., Simoncini, N., & Virgili, R. (2007). Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by a HPLC-FLD quantitative method. Journal of Chromatography B, 855(2), 242-248.

Taniwaki, M. H., & Silva, N. D. (2001). Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas: Núcleo de microbiologia/ITAL.

# **Anexos**



Anexos

**Quadro 9:** Lista de amostras de presunto de suíno, analisadas no presente estudo, suas características e respetivas concentrações de OTA.

Lote	Matéria-Prima	Amostras Código	1ª Colheita		2ª Colheita	
			Cura (meses)	OTA (µg/kg)	Cura (meses)	OTA (µg/kg)
A	Suíno	PRES12A	20	< LD	-	-
A	Suíno	PRES14A	20	< LQ	-	-
A	Suíno	PRES15A	20	< LD	-	-
A	Suíno	PRES16A	20	25,86	-	-
A	Suíno	PRES17A	20	< LD	-	-
A	Suíno	PRES14Ai	23	< LD	-	-
A	Suíno	PRES15Ai	23	< LD	-	-
A	Suíno	PRES16Ai	23	< LD	-	-
B	Suíno	PRES1B	20	< LD	-	-
B	Suíno	PRES2B	20	< LD	-	-
B	Suíno	PRES3B	20	< LQ	-	-
B	Suíno	PRES4B	20	< LD	-	-
B	Suíno	PRES5B	20	< LD	-	-
B	Suíno	PRES6B	20	99,12	-	-
B	Suíno	PRES7B	20	3,14	-	-
B	Suíno	PRES8B	20	< LD	-	-
B	Suíno	PRES2Bi	23	< LD	-	-
B	Suíno	PRES3Bi	23	< LD	-	-
B	Suíno	PRES4Bi	23	< LD	-	-
B	Suíno	PRES6Bi	23	4,1	-	-
B	Suíno	PRES7Bi	23	7,2	-	-
C	Suíno	PRES3C	20	< LD	-	-
C	Suíno	PRES6C	20	25,44	25	2,22
C	Suíno	PRES8C	20	< LD	-	-
C	Suíno	PRES9C	20	< LD	25	< LD
C	Suíno	PRES11C	20	< LQ	-	-
C	Suíno	PRES12C	20	< LD	-	-
C	Suíno	PRES13C	20	< LD	-	-
D	Suíno	PRES12D	19	< LD	-	-
D	Suíno	PRES13D	19	2,96	24	< LD
D	Suíno	PRES14D	19	< LD	24	< LD
D	Suíno	PRES15D	19	< LD	-	-
E	Suíno	PRES32E	14	<LD	20	3,48
E	Suíno	PRES33E	14	< LD	-	-
E	Suíno	PRES34E	14	< LD	20	< LD
E	Suíno	PRES35E	14	< LD	-	-
E	Suíno	PRES37E	14	< LD	20	< LD
E	Suíno	PRES38E	14	< LD	20	< LD
E	Suíno	PRES39E	14	< LD	-	-
E	Suíno	PRES41E	14	< LD	-	-
E	Suíno	PRES48E	20	-	25	< LD
G	Suíno	PRES45G	14	< LD	-	-
G	Suíno	PRES47G	14	< LD	-	-
G	Suíno	PRES50G	14	< LD	-	-
G	Suíno	PRES56G	14	< LD	-	-
G	Suíno	PRES48G	14	< LD	-	-
G	Suíno	PRES49G	14	< LD	-	-
G	Suíno	PRES51G	14	< LD	-	-
G	Suíno	PRES52G	14	< LD	-	-
G	Suíno	PRES54G	14	< LD	-	-
G	Suíno	PRES55G	14	< LD	-	-
G	Suíno	PRES57G	14	< LD	-	-
G	Suíno	PRES58G	14	< LD	-	-
G	Suíno	PRES59G	14	< LD	-	-

(continua)

**Quadro 10:** Lista de amostras de presunto de suíno, analisadas no presente estudo, suas características e respectivas concentrações de OTA (continuação).

Lote	Matéria-Prima	Amostras Código	1ª Colheita		2ª Colheita	
			Cura (meses)	OTA (µg/kg)	Cura (meses)	OTA (µg/kg)
H	Suíno	PRES3H	13	< LD	-	-
H	Suíno	PRES4H	13	< LD	-	-
H	Suíno	PRES5H	13	< LQ	-	-
H	Suíno	PRES6H	13	< LD	-	-
H	Suíno	PRES10H	13	< LD	-	-
H	Suíno	PRES11H	13	< LD	-	-
H	Suíno	PRES12H	13	< LD	-	-
I	Suíno	PRES14I	13	< LD	-	-
I	Suíno	PRES15I	13	< LQ	-	-
I	Suíno	PRES16I	13	< LQ	-	-
I	Suíno	PRES20I	13	< LD	-	-
I	Suíno	PRES21I	13	< LD	-	-
I	Suíno	PRES22I	13	< LD	-	-
I	Suíno	PRES23I	13	-	-	-

**Quadro 11:** Lista de amostras de presunto de caprino, analisadas no presente estudo, suas características e respectivas concentrações de OTA.

Lote	Matéria-Prima	Código	Cura (meses)	OTA (µg/kg)
EE	Cabra	PREC8EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC9EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC10EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC11EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC12EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC13EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC14EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC15EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC17EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC18EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC19EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC20EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC21EE	3	< LD
EE	Cabra	PREC22EE	3	< LD

\*LOD (ng/mL) = 0,51

\*LOQ (ng/mL) = 2,1