



**Rui Rafael Góis
Fernandes**

**MICOTOXINAS: a situação actual da legislação e
metodologias analíticas**



**Rui Rafael Góis
Fernandes**

**MICOTOXINAS: a situação actual da legislação e
metodologias analíticas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de MESTRE em QUÍMICA e QUALIDADE dos ALIMENTOS, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Celeste de Matos Lino
Professora Associada com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Tenho para mim que um trabalho desta natureza é essencialmente um trabalho individual. No entanto, devo reconhecer também que há estímulos de diversa proveniência que contribuem para a prossecução de uma TESE de MESTRADO que merecem ser realçados.

Assim, é meu desejo expressar os sinceros agradecimentos:

À Prof. Doutora Ivonne Delgadillo, orientadora desta TESE de MESTRADO, pela disponibilidade revelada ao longo destes cerca de dois anos, com prejuízo de alguns dos seus fins-de-semana e principalmente pelas críticas e sugestões relevantes que proferiu durante a orientação.

Aos colegas do Mestrado, pela amizade patenteada.

À MINHA MÃE, pelo estímulo e apoio incondicional desde a primeira hora; pela paciência, amizade e compreensão reveladas ao longo destes quarenta anos.

E ainda a todas as pessoas que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização desta Tese de Mestrado, incluindo aqui os meus irmãos, a minha esposa e família e os meus sobrinhos pelos períodos de descontração proporcionados.

palavras-chave

micotoxinas, legislação, limites máximos, metodologia analítica.

resumo

O presente trabalho apresenta os desenvolvimentos mais recentes no que concerne às micotoxinas, em relação às metodologias analíticas utilizadas na sua determinação e à situação actual em termos de legislação e limites máximos para algumas micotoxinas.

Com o presente trabalho pretende-se fazer uma compilação das técnicas analíticas utilizadas na detecção e quantificação das micotoxinas que mais frequentemente ocorrem nas rações e produtos alimentares, nomear os desenvolvimentos mais recentes no que concerne aos novos métodos e a situação actual em termos de legislação nacional e comunitária, arrolando os limites máximos propostos e consolidados em legislação para algumas micotoxinas.

O trabalho está dividido em cinco capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma breve narrativa sobre as micotoxinas e a micologia. Um segundo capítulo faz referência às micotoxinas mais estudadas (sua características, microrganismos que as produzem e doenças com as quais estão implicadas). O terceiro capítulo é dedicado às metodologias analíticas e aos métodos comumente utilizados na análise de micotoxinas. O quarto capítulo apresenta de uma forma sucinta a legislação existente a nível nacional e comunitário bem como os limites máximos para as várias micotoxinas. Finalmente o último capítulo faz-se a compilação da bibliografia e de um conjunto de relatórios técnicos.

keywords

mycotoxins, legislation, maximum limits, analytical methodology.

abstract

The current work presents the most recent developments concerning mycotoxins, in regard to the analytic methodologies utilized in their determination and the actual situation in terms of legislation as well as the maximum limits for some mycotoxins.

Throughout this essay it is intended to make a compilation of the analytical techniques used in the detection and quantification of mycotoxins which occur most frequently in feed and food products, to designate the latest developments regarding the new methods and the current situation in terms of national and EU legislation, listing the maximum limits proposed and consolidated in legislation for some mycotoxins.

The manuscript is divided in five chapters. The first chapter is composed by a brief account on mycotoxins and mycology. A second chapter makes reference to some of the more studied mycotoxins (their characteristics, the microorganisms that produce them and the illnesses with which they are implicated). The third chapter is dedicated to the analytic methodologies and methods most commonly utilized in the mycotoxins' analysis. The fourth chapter presents in brief the legislation established in the national and European Union as well as the maximum limits for the various mycotoxins. Finally, in the last chapter is enclosed the compilation of the bibliography and of a set of technical reports.

Índice

SIGLAS e ABREVIATURAS	V
GLOSSÁRIO.....	VII
OBJECTIVOS	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 MICOLOGIA.....	17
1.2 MICOTOXINAS.....	18
1.3 Sinergismo entre micotoxinas.....	29
2 MICOTOXINAS	33
2.1 AFLATOXINAS	33
2.1.1 Definição e Ocorrência.....	33
2.1.2 Propriedades Químicas e Físicas	34
2.1.3 Aspectos toxicológicos	37
2.2 MICOTOXINAS produzidas pelo FUSARIUM.....	41
2.2.1 FUMONISINAS.....	43
2.2.1.1 Definição e Ocorrência	43
2.2.1.2 Propriedades Químicas e Físicas.....	45
2.2.1.3 Aspectos toxicológicos	46
2.2.2 TRICOTECENOS	49
2.2.2.1 Definição e Ocorrência	49
2.2.2.2 Propriedades Químicas e Físicas.....	50
2.2.2.3 Aspectos toxicológicos	52
2.2.3 DESOXINIVALENOL	53
2.2.3.1 Definição e Ocorrência	53
2.2.3.2 Propriedades Químicas e Físicas.....	54
2.2.3.3 Aspectos toxicológicos	55
2.2.4 ZEARALENONA	56
2.2.4.1 Definição e Ocorrência	56
2.2.4.2 Propriedades Químicas e Físicas.....	57
2.2.4.3 Aspectos toxicológicos	57

2.3	<i>OCRATOXINAS</i>	59
2.3.1	Definição e Ocorrência.....	59
2.3.2	Propriedades Químicas e Físicas.....	60
2.3.3	Aspectos toxicológicos.....	61
2.4	<i>PATULINA</i>	63
2.4.1	Definição e Ocorrência.....	63
2.4.2	Propriedades Químicas e Físicas.....	64
2.4.3	Aspectos toxicológicos.....	65
2.5	<i>PRÁTICAS PARA PREVENIR E CONTROLAR A CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS</i>	66
2.6	<i>PRECAUÇÕES A TER NA MANIPULAÇÃO DE MICOTOXINAS</i>	70
2.7	<i>A situação em Portugal e na UE</i>	72
2.7.1	Compilação de dados de ocorrência das toxinas de Fusarium em alimentos e avaliação da ingestão pela dieta pela população dos Estados Membro da UE (Abr 2003)	73
2.7.1.1	Dados de Ocorrência.....	73
2.7.1.2	Sumário dos dados sobre o consumo	75
2.7.1.3	Sumário da ingestão pela dieta	76
2.7.1.4	Conclusões.....	78
2.7.2	Compilação de dados de ocorrência da ocratoxina A em alimentos e avaliação da ingestão pela dieta pela população dos Estados Membro da UE.....	79
2.7.2.1	Dados sobre o consumo	80
2.7.3	Compilação de dados de ocorrência da patulina em alimentos e avaliação da ingestão pela dieta pela população dos Estados Membro da UE.....	84
2.7.3.1	Recomendações para uma exposição máxima	85
2.7.3.2	Dados sobre a ocorrência.....	86
3	METODOLOGIAS ANALÍTICAS USADAS NA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS	89
3.1	<i>GENERALIDADES</i>	89
3.1.1	Validação de Métodos.....	95
3.2	<i>AMOSTRAGEM E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA</i>	97
3.3	<i>EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO</i>	99
3.4	<i>MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO</i>	101
3.4.1	Métodos Cromatográficos	102
3.4.1.1	Cromatografia líquida de Alta Performance (HPLC)	103
3.4.1.2	Cromatografia em camada fina (TLC).....	105
3.4.1.3	Cromatografia gasosa (GC)	107

3.4.2	Métodos Imunológicos	108
3.4.3	Outros métodos.....	110
3.4.3.1	Detecção por U.V.....	111
3.4.3.2	Cromatografia líquida com detecção por espectrometria massa (LC-MS).....	112
3.4.3.3	Espectrometria de Infravermelho Próximo (NIR).....	113
3.4.3.4	Biossensores.....	114
3.4.3.5	Nariz Electrónico	116
3.4.3.6	Análise de Imagem (Image analysis)	116
3.4.3.7	Inactivação Química	117
3.4.3.8	Polarização de fluorescência	119
3.5	<i>CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE</i>	120
3.6	<i>A METODOLOGIA ANALÍTICA POR MICOTOXINA</i>	121
3.6.1	Aflatoxinas	121
3.6.1.1	EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO	121
3.6.1.2	DERIVATIZAÇÃO	123
3.6.1.3	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	124
3.6.1.4	CONFIRMAÇÃO.....	129
3.6.2	Fumonisinias.....	130
3.6.2.1	EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO	130
3.6.2.2	DERIVATIZAÇÃO	133
3.6.2.3	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	134
3.6.2.4	CONFIRMAÇÃO.....	142
3.6.3	Ocratoxina A	142
3.6.3.1	EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO	142
3.6.3.2	DERIVATIZAÇÃO	146
3.6.3.3	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	147
3.6.3.4	CONFIRMAÇÃO.....	152
3.6.4	Patulina.....	153
3.6.4.1	EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO	153
3.6.4.2	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	156
3.6.4.3	CONFIRMAÇÃO.....	160
3.6.5	Tricotecenos	161
3.6.5.1	EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO	161
3.6.5.2	DERIVATIZAÇÃO	162
3.6.5.3	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	162
3.6.6	Zearalenona	171
3.6.6.1	EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO	171
3.6.6.2	DERIVATIZAÇÃO	172

3.6.6.3	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.....	172
3.6.6.4	CONFIRMAÇÃO.....	174
3.7	<i>MÉTODOS MULTIMICOTOXINAS ou de MULTIDETECÇÃO</i>	177
4	LEGISLAÇÃO e LIMITES	183
4.1	<i>INTRODUÇÃO</i>	183
4.2	<i>LIMITES MÁXIMOS e ou RECOMENDADOS</i>	188
4.3	<i>LIMITES MÁXIMOS CONSOLIDADOS</i>	193
4.4	<i>LEGISLAÇÃO EXISTENTE</i>	197
4.4.1	Disposições legais ao nível da UE no que diz respeito às micotoxinas.....	199
4.4.1.1	As medidas de salvaguarda específicas	200
4.5	<i>Quadro (cronológico) da Legislação Comunitária e Nacional</i>	208
4.5.1	Legislação Comunitária.....	208
4.5.2	Legislação Nacional	210
5	BIBLIOGRAFIA e ANEXOS	211
5.1	<i>PUBLICAÇÕES</i>	211
5.2	<i>RELATÓRIOS E OUTROS DOCUMENTOS</i>	230
	Quadro I - Toxicidade e efeitos biológicos de algumas micotoxinas encontradas em alimentos	233
	Quadro II - Algumas das micotoxinas mais comuns e os organismos que as produzem..	234
	Quadro III - Alguns efeitos tóxicos de algumas micotoxinas	237
5.3	<i>LEGISLAÇÃO (consultada)</i>	238
5.3.1	Legislação comunitária	238
5.3.2	Legislação nacional (Portuguesa).....	240
5.3.3	Legislação geral	242

SIGLAS e ABREVIATURAS

- 3-acetylDON = 3-acetil-desoxinivalenol
15-acetylDON = 15-acetil-desoxinivalenol
3,15-diacetylDON = 3,15-diacetil-desoxinivalenol
AFB1/AFG1/AFM1= Aflatoxina B1/Aflatoxina G1/Aflatoxina M1
ALARA = *As low as reasonably achievable* = tão baixo quanto razoavelmente possível
AOAC International = *Association of Official Analytical Chemists International* = Associação dos Químicos Analíticos Oficiais
AQA = *Analytical quality assurance* = garantia da qualidade analítica
APCI = *Atmospheric pressure chemical ionization*
APPI = *Atmospheric pressure photochemical ionization*
BCR = *Bureau Communautaire de Référence* = Comité/Gabinete Comunitário de Referência da EU
BSA = N,O-bis(trimetilsilil)acetamida
CAC = *Codex Alimentarius Commission* = Comissão do Codex Alimentarius
CAS = *Chemical Abstracts Service*
CCAH = Comité Científico da Alimentação Humana
CCFAC = *Codex Committee on Food Additives and Contaminants* = Comité do *Codex Alimentarius* sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes
CD-ELISA = *competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay* = Método imunológico ELISA competitivo directo
CEN = *Comité Européen de Normalisation / European Standardization Committee* = Comité Europeu de Normalização
CMCFCPE = *UK Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment*
DAD = *Diode Array Detection*
DAS = Diacetoxiscirpenol
DON = Desoxinivalenol
EC = *European Commission* = Comissão Europeia (CE)
ECS = *European Committee for Standardization*
EFSA = *European Food Safety Authority* = Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EFTA = *European Free Trade Association* = Associação Europeia de Comércio Livre
EIA = *Enzyme immunoassay* = ensaio imuno-enzimático
ELISA = *enzyme linked immunosorbent assay*
ERG = *ergot alkaloids* = alcalóides de Ergot
EU = *European Union* = União Europeia (UE)
FAO = *Food and Agriculture Organization (of United Nations)* = Organização para a Agricultura e Alimentação (das Nações Unidas)
FAPAS = *Food analysis performance assessment scheme (UK)* = Programa de avaliação da qualidade na análise química de alimentos
FDA = *Food and Drug Administration (USA)* = Administração (Federal) para os Alimentos e Medicamentos
FDK = *Fusarium damaged kernels*
FB1 ou FUMB1 e FB2 ou FUMB2 = Fumonisina B1 e Fumonisina B2

GC = *gas chromatography*
 GI tract = *gastrointestinal tract* = tracto gastrointestinal
 HEC = *Human esophagic cancer* = cancro de esófago humano
 HFBI = heptafluorobutirilimidazol
 HLB = *hydrophilic-lipophilic balance*
 HMDS = hexametildisilazano
 HMF = *hydroxymethylfurfural*
 HPLC = *High performance liquid chromatography* = Cromatografia líquida de alta performance/pressão
 HPTLC = *high performance thin layer chromatography* = Cromatografia de camada fina de alta performance/pressão
 HT-2 = Toxina HT-2
 IARC = *International Agency for Research on Cancer* = Agência Internacional para a pesquisa sobre o cancro
 ISO = *International Organization for Standardization* = Organização Internacional de Normalização
 JECFA = *Joint (Food and Agricultural Organization and World Health Organization) Expert Committee on Food Additives*
 JRC/IRMM = *Joint Research Centre/Institute for Reference Materials and Measurements*
 MECC = *micellar electrokinetic capillary chromatography* = Cromatografia capilar electrocinética micelar
 MERCOSUR = Mercado Comum (da América) do Sul
 NOAEL = *No observed adverse effect level* = Nível (dose) sem efeito adverso observável
 NOEL = *no observed effect level*
 OTA = OA = Ocratoxina A
 PAT = Patulina
 PFBI = pentafluorobutirilimidazol
 PM = peso molecular
 PMTDI = *Provisional maximum tolerable daily intake* = ingestão diária máxima tolerável provisória
 PTDI = *Provisional tolerable daily intake* = ingestão diária tolerável provisória
 PTWI = *Provisional tolerable weekly intake* = ingestão semanal tolerável provisória
 RASFF = *Rapid Alert System for Food and Feed*
 SCF = *Scientific Committee for Food*
 SCOOP = *Scientific cooperation on questions relating to food* = cooperação na análise científica de questões relacionadas com os produtos alimentares
 SPE = *Solid Phase Extraction* = Extração em fase sólida
 SMT = *Standards, measurements and testing* = Padrões, medidas e testes
 TFAA = anidrido trifluoro acético
 TLC = *thin layer chromatography* = Cromatografia de camada fina
 TMCS = trimetilclorosilano
 TMS = trimetilsilil
 TMSI = TMSIM = trimetilsililimidazol
 USDA = *United States Department of Agriculture*
 WHO = *World Health Organization* = Organização Mundial da Saúde
 WTO = *World Trade Organisation*
 ZEA = ZON = Zearalenona

GLOSSÁRIO

ADI (*Acceptable Daily Intake*) – Ingestão diária aceitável

A estimativa da quantidade de resíduo expressa em termos de massa corporal, usualmente em microgramas ou miligramas por quilograma de peso corporal, que pode ser ingerida diariamente durante a vida inteira pelo ser humano, sem risco apreciável para a saúde.

Obs.: O ADI é mais usado para aditivos alimentares e o TDI é usado para contaminantes. Para o cálculo da ingestão diária por pessoa é usada uma massa corporal padrão de 60 quilogramas.

Carcinogenicidade

Processo de indução de neoplasmas malignos por agentes químicos, físicos ou biológicos.

CRM (*Cerified Reference Materials*) – materiais de referência certificados

são materiais contendo uma quantidade conhecida ou certificada do(s) analito(s). São pois ferramentas essenciais na comparabilidade, rastreabilidade e veracidade dos dados analíticos e preciosos no controlo de qualidade analítico. Assim, o uso de (C)RM's é um requisito importante para a acreditação de acordo com a ISO/IEC 17025 (*International Organisation for Standardisation*, 1999).

Dose

A quantidade total da substância administrada, tomada ou absorvida por um organismo.

ELEM (*equine leucoencephalomalacia*) – Leucoencefalomalacia equínea

É uma enfermidade (neurológica) geralmente fatal dos cavalos (e outros equídeos) causada pela ingestão de rações contaminadas com toxinas produzidas pelo fungo *Fusarium*. O desenvolvimento do fungo e suas toxinas (fumonisinas B1 e B2) está intimamente relacionado com a humidade e a ocorrência de quedas de temperatura que causam choque térmico. Os sinais clínicos caracterizam-se por anorexia, sonolência e depressão ou hiperexcitabilidade, dificuldade de apreensão de alimentos e mastigação, tremores, pressão da cabeça contra objectos, cegueira uni ou bilateral e decúbito. As lesões macroscópicas caracterizam-se por aumento de tamanho de um dos hemisférios cerebrais com amolecimento das circunvoluções. Ao corte, a substância branca do cérebro está amarelada, com áreas de malácia (amolecimento patológico), observando-se, geralmente, cavidades contendo fluido. A cápsula interna e o tálamo geralmente estão afectados. Observam-se (raramente) áreas amareladas ou hemorrágicas nos tubérculos quadrigêmeos, pedúnculos cerebrais, ponte e medula oblonga. As lesões são, geralmente unilaterais e quando bilaterais são mais marcadas em um dos lados do encéfalo.

Fetotóxico

Tóxico para o feto/embrião.

Genotoxicidade

Capacidade para causar danos ao material genético. Tais danos podem ser mutagénicos e ou carcinogénicos.

Hematócitos

Elementos celulares do sangue - eritrócitos, leucócitos e plaquetas - produzidos na medula óssea.

Hepatotóxico

Tóxico para o fígado ou as células do fígado.

Hepatomegalia

Fígado dilatado. Aumento do tamanho do fígado. Indica a existência de uma hepatopatia (doença do fígado). No entanto, muitos indivíduos com hepatopatias apresentam um fígado de tamanho normal ou mesmo menor do que o normal. Geralmente, a hepatomegalia é assintomática (não produz sintomas). Quando o aumento de volume do fígado é acentuado, pode causar desconforto abdominal ou uma sensação de plenitude. Quando esse aumento de volume ocorre rapidamente, o fígado pode tornar-se sensível à apalpação. Quando o aumento é causado por uma cirrose, o fígado é firme e irregular. A presença de nódulos bem definidos normalmente sugere um câncer.

Imunossupressão

Redução da capacidade funcional da resposta imunitária

Imunotóxico

Tóxico para o sistema imunitário

LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*)

A dose mais baixa onde se observa um efeito adverso. A menor dose (concentração da substância) administrada num estudo de toxicidade na qual se observa um efeito adverso (alteração considerada adversa).

LOEL (*Lowest Observed Effect Level*)

A dose mais baixa onde se observa um efeito qualquer que ele seja. A menor dose (concentração da substância) administrada num estudo de toxicidade na qual se observa um efeito, uma alteração na morfologia, capacidade funcional, crescimento, etc., distinguível dos organismos de controlo.

MRL (*Maximum Residue Limits*) – Limite máximo do resíduo

A concentração máxima de resíduo resultante do uso de um produto medicinal veterinário (expresso em mg/Kg ou µg/Kg de peso fresco) que pode ser aceite pela UE como sendo legalmente permitida ou reconhecida como aceitável em ou num alimento.

Micologia

Ramo da ciência que estuda os fungos, a sua forma, estrutura, processos vitais, modo de vida, ecologia, origem, classificação e distribuição.

Micotoxicologia

Ciência que estuda as micotoxinas.

Micotoxicose

Doença causada por micotoxina(s).

Mutagéneo

Qualquer substância que pode provocar mutações (herdáveis) do genótipo numa célula como consequência de alterações ou perda de genes ou cromossomas.

Mutagenicidade

Capacidade de um agente físico, químico ou biológico para provocar mutações (herdáveis) do genótipo numa célula como consequência de alterações ou perda de genes ou cromossomas.

Nefrotóxico

Tóxico para os rins ou quimicamente prejudicial às células dos rins.

Neuropatia

Qualquer doença do sistema nervoso central ou periférico.

Neurotóxico/Neurotoxicidade

Tóxico para os nervos ou com capacidade de produzir quimicamente um efeito adverso no sistema nervoso. Tais efeitos podem ser subdivididos em dois tipos: efeitos no sistema nervoso central (incluindo efeitos na performance e demência pré-senil como por exemplo a doença de Alzheimer) e efeitos no sistema nervoso periférico (tais como os efeitos inibidores dos compostos organofosforados na transmissão sináptica).

NOAEL (*No observed adverse effect level*)

A dose onde não se observa nenhum efeito adverso (ou sem efeito adverso observado), i.e., é a maior concentração (dose) administrada da substância (testada) num estudo de toxicidade que não causa (ou no qual não se observa) nenhum efeito adverso em pessoas ou animais.

A dose à qual não existe biológica ou estatisticamente um aumento significativo na frequência ou severidade de efeitos entre o grupo exposto e o de controlo.

NOEL (*No observed effect level*)

A dose onde não se observa qualquer efeito, i.e., é a maior concentração da substância encontrada por observação e/ou experimentação, que não causa alterações fisiopatológicas nos organismos tratados, diferentes daqueles observados nos controlos da mesma espécie, sob as mesmas condições do ensaio.

Para contaminantes que não se acumulam no organismo

PMTDI (*Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*) – Ingestão provisória diária máxima tolerável.

Para contaminantes que se podem acumular no organismo:

PTWI (*Provisional tolerable weekly intake*) – Ingestão semanal tolerável provisória.

ppb (partes por bilião) = ng/g = µg/kg

ppm (partes por milhão) = µg/g = mg/kg

Resorção

O processo orgânico em que a substância de alguma estrutura diferenciada que foi produzida pelo corpo, sofre lise e assimilação.

Síndrome de “Kwashiorkor”

Trata-se de uma forma de mal nutrição resultante de uma ingestão inadequada de proteínas. Quando a desnutrição é grave faz-se acompanhar de edema nutricional, despigmentação da pele e do cabelo, dificuldade de crescimento, perda de massa muscular e diminuição da imunidade.

Síndrome de “Reye”

Associado a uma encefalopatia de causa desconhecida com degeneração hepática. Afecta as crianças e caracteriza-se por um início rápido com sintomas muito variáveis. Podem apresentar variações do estado mental que incluem delírio, comportamento agressivo e coma. Os sobreviventes ficam com anormalidades neurológicas e atraso mental (*in* <http://thearc.org/faqs/reyes.html>).

Soro

O fluido amarelado claro obtido após separar o sangue inteiro nos seus componentes líquidos e sólido depois de ter sido coagulado. Também chamado soro sanguíneo.

TDI (tolerable daily intake) – ingestão diária tolerável

Valor equivalente à ingestão diária aceitável estabelecido pelo *European Commission Scientific Committee on Food*.

Obs.: Ao contrário do ADI, o TDI é expresso em mg/pessoa, assumindo um peso corporal de 60 kg. O TDI é normalmente usado para contaminantes alimentares.

Teratogéneo

Agente que, quando administrado “prenatalmente” (à mãe), induz malformações estruturais permanentes ou defeitos no feto ou descendência.

Teratogenicidade

Potencial para causar ou produzir malformações estruturais ou defeitos no feto.

Teratogénico

Indutor de malformações fetais.

Toxinfecções Alimentares

São doenças provocadas pela ingestão de alimentos contaminados por microorganismos e suas toxinas. Os sintomas manifestam-se algumas horas após a ingestão dos alimentos, podendo persistir por vários dias.

OBJECTIVOS

Face à importância crescente das micotoxinas na alimentação humana e animal, as quais podem constituir um problema de segurança alimentar e de saúde pública, os objectivos deste trabalho centram-se em:

- Efectuar uma revisão bibliográfica dos desenvolvimentos mais recentes em relação ao conhecimento científico sobre as implicações das micotoxinas na saúde humana;
- Compilar a legislação existente a nível nacional e comunitário. Tendo em conta o incremento das trocas comerciais internacionais, recolher a informação possível sobre a legislação de países terceiros;
- Tomar conhecimento da situação actual do controlo da presença de micotoxinas em Portugal;
- Fazer um levantamento da metodologia analítica mais utilizada na detecção e quantificação de micotoxinas.

1 INTRODUÇÃO

A segurança alimentar, tendo como objectivo primordial a saúde pública e os direitos dos consumidores, é um direito de cidadania, podendo aquele ser atingido, nomeadamente através da informação ao cidadão sobre os riscos inerentes à alimentação e às formas de os prevenir. É também actualmente um importante problema a nível mundial, tanto nos países desenvolvidos como nos em vias de desenvolvimento, afectando uma considerável percentagem da população ocasionando anualmente numerosas vítimas por toxinfecções alimentares.

Numa dieta humana variada normal, é possível uma exposição constante a níveis baixos de diversas toxinas, pelo que importa actualizar esta temática, numa óptica de segurança alimentar.

As crises ocorridas na cadeia alimentar têm constituído um factor de insegurança que importa dissipar, sendo fundamental informar os cidadãos, com vista a promover a consciencialização de que todos podem e devem contribuir no processo de promoção da segurança alimentar uma vez que esta não passa apenas pelos operadores económicos, mas também pelos consumidores, nomeadamente no que respeita ao manuseamento, conservação e confecção dos alimentos.

Os perigos químicos que afectam a cadeia alimentar são de vária ordem, de natureza diversa e com graus de toxicidade variável, existindo uma enorme gama de substâncias indesejáveis que podem, por diferentes razões, ocorrer na cadeia alimentar e constituir perigo para a saúde dos consumidores.

Pela importância que têm vindo a assumir, certos grupos de substâncias, contaminantes e resíduos, são objecto de medidas de gestão do risco que envolvem legislação específica e programas de controlo coordenado a nível da UE. Os contaminantes, alvo de legislação comunitária, incluem algumas micotoxinas que são matéria de estudo nesta dissertação.

Por razões de saúde pública torna-se necessário controlar os teores de micotoxinas e em especial das aflatoxinas, consideradas substâncias genotóxicas e cancerígenas, que podem estar presentes numa grande variedade de alimentos, entre eles, nos frutos secos, cereais e oleaginosas.

O nível actual dos conhecimentos científicos e técnicos e os melhoramentos introduzidos nas técnicas de produção e armazenagem não impedem o desenvolvimento destes bolores, pelo que não é possível eliminar completamente a presença de aflatoxinas nos alimentos. Assim é necessário um controlo adequado das aflatoxinas que são produzidas em condições apropriadas de temperatura e humidade.

Para as micotoxinas, nomeadamente as aflatoxinas e a ocratoxina A, estão legalmente fixados limites máximos em diversos géneros alimentícios, desde frutos secos até cereais, que obrigam a controlos complexos no que concerne aos planos de amostragem e à metodologia analítica a utilizar e exige meios cientificamente avançados e algo dispendiosos.

No que diz respeito à patulina, pesquisas prévias sobre uma gama de alimentos não indicaram quaisquer problemas relacionados com esta micotoxina. Sugeriram sim que o sumo de maçã era (e é) a maior fonte de contaminação por patulina. Assim, estão também fixados limites máximos em sumos de maçã, em produtos sólidos à base de maçã (compota e puré para lactentes e crianças jovens) e outros alimentos para bebés.

Até à data não existem limites máximos estabelecidos para as fumonisinas (a não ser em alguns países, por exemplo, Suíça). Por outro lado, o Comité Científico de Alimentação Humana (CCAH) procedeu à avaliação de toxinas de *Fusarium* e considerou que os dados disponíveis não apoiavam a fixação de uma única dose diária admissível (DDA).

Os resultados do controlo de vigilância das colheitas efectuado em 2003, indicaram que o milho e os produtos à base de milho são os principais veículos de contaminação por fumonisinas. Foi então fixada uma DDA de 2 µg/kg de massa corporal para o total das fumonisinas, estremes ou em combinação.

Caso não seja fixado um teor específico antes de 1 de Outubro de 2007, existem teores previstos a aplicar a partir dessa data para o milho não transformado; farinha de milho, sêmola de milho e semolina de milho; alimentos à base de milho para consumo directo; e alimentos destinados a lactentes e crianças jovens e alimentos para bebés à base de milho transformado.

Em cereais e derivados também estão fixados limites máximos para alguns tricotecenos, nomeadamente para o DON e ZEA. Os dados relativos à presença das toxinas T-2 e HT-2 são, até ao momento, limitados. Contudo, as estimativas relativas à ingestão indicam claramente que a presença das toxinas T-2 e HT-2 pode constituir um problema para a saúde pública pelo que será fixado um teor máximo, se apropriado, antes de 1 de Julho de 2007.

Infelizmente não é possível uma solução radical e definitiva. Os fungos estão no nosso mundo, à nossa volta, em nós próprios e atacam-nos quando apanham uma oportunidade de alguma fragilidade. Podemos reduzir essas oportunidades de ataque seguindo os cuidados básicos de higiene e fazendo uma vida saudável, alimentação correcta e variada, rica em frutos e legumes, exercício físico, etc.

Com esta dissertação de Mestrado, pretende-se dar a conhecer os desenvolvimentos mais recentes no que concerne às micotoxinas que são definidas como sendo compostos naturais, produzidos pelo metabolismo secundário de fungos e que ocasionam contaminações em alimentos, nalguns casos graves podendo mesmo levar à morte.

Sob o ponto de vista estritamente toxicológico algumas micotoxinas constituem, um perigo para a saúde. Infelizmente, a informação da toxicidade, estabilidade e da extensão da ocorrência é limitada para muitas das micotoxinas que foram já identificadas.

Por outro lado, a presença de múltiplas toxinas no mesmo sistema é uma causa nova de interesse, uma vez que a informação sobre as potenciais interacções entre estes compostos bem como a informação toxicológica dos efeitos da exposição simultânea é ainda muito limitada. Todavia uma gestão apropriada do risco pode levar a que este seja controlado.

Os consumidores têm o direito de esperar que lhes sejam fornecidas informações úteis e claras sobre a qualidade e os constituintes dos alimentos, por forma a poderem escolher com conhecimento de causa e querem ter a certeza de que os alimentos que consomem são seguros, nutritivos e produzidos de acordo com as normas.

A abordagem integrada da UE em relação à segurança dos alimentos visa garantir um nível elevado de segurança dos alimentos, saúde e bem estar tanto dos animais como dos humanos, no seio da União Europeia, por meio de medidas coerentes e de uma vigilância adequada, assegurando simultaneamente o funcionamento efectivo do mercado interno.

Em consequência destas preocupações, a Comissão Europeia endereçou esforços para o levantamento de informação sobre a exposição do cidadão comunitário a várias micotoxinas, nomeadamente ocratoxina A, patulina e toxinas produzidas pelo género *Fusarium* [ver [Relatórios “Reports on tasks for scientific cooperation”](#)].

No Livro Branco sobre a Segurança dos Alimentos, a Comissão Europeia delineou uma política proactiva no domínio alimentar, visando modernizar a legislação, reforçar os sistemas de controlo “desde a exploração agrícola até à mesa do consumidor” e potenciar a capacidade do sistema de aconselhamento científico, de modo a garantir um elevado nível de protecção da saúde humana e de defesa do consumidor. Com este instrumento procurou-se fundamentalmente contribuir para aumentar a confiança dos consumidores na política de segurança dos alimentos da UE, com base numa abordagem coerente, dinâmica e transparente, que para ser eficaz implica a rastreabilidade dos alimentos para consumo humano e dos alimentos para animais, bem como dos respectivos ingredientes.

Tendo presente o atrás exposto, e atendendo a que desenvolvo a actividade profissional na área da segurança alimentar como técnico superior no Instituto do Consumidor, um organismo da administração pública cuja missão é promover e salvaguardar os direitos dos consumidores, a promoção e produção de informação consubstanciada sobre determinadas matérias que fazem parte da preocupação do consumidor em geral, achou-se proveitoso delinear e produzir um trabalho nos moldes em que este é apresentado.

1.1 MICOLOGIA

O Homem conhece os fungos desde a antiguidade, utilizando-os em seu próprio benefício, tanto para melhorar alimentos, como para fins terapêuticos.

A micologia é um ramo da ciência que estuda os fungos, a sua forma, estrutura, processos vitais, modo de vida, ecologia, origem, classificação e distribuição. Esta ciência tem muitas aplicações, que vão desde o combate de doenças provocadas por fungos até à biotecnologia, incluindo a produção de antibióticos e enzimas, a fermentação do vinho e da cerveja, o fabrico do pão e a produção de corantes. A micotoxicologia pode definir-se amplamente como o estudo das micotoxinas.

Uma infecção por fungos é denominada de micose. Um metabolito secundário produzido por fungos é denominado micotoxina sendo apenas considerada tóxica se o metabolito fúngico causa doença ou morte em humanos ou animais. A doença (intoxicação) causada por uma micotoxina é denominada micotoxicose.

Os fungos são organismos extraordinários que a ciência colocou num reino próprio (Reino *Fungi*), possuindo uma enorme capacidade de adaptação e colonização dos mais diversos meios. Estão presentes em quase todos os nichos ecológicos e são um grupo muito diversificado e numeroso (in <http://www.naturlink.pt/canais/Artigo.asp?iArtigo=12146&iLingua=1>).

Estão descritas cerca de 69 mil espécies de fungos embora estejam estimadas um milhão e meio de espécies diferentes por todo o mundo (Hawksworth, 1991).

Os fungos produzem uma enorme diversidade de estruturas químicas que apresentam uma actividade biológica extensamente variada. Determinados fungos são componentes altamente desejados e favoráveis em certos alimentos, como por exemplo na produção de queijo ou no processo de fermentação das cervejas e vinhos, enquanto outros são usados na obtenção de antibióticos valiosos, nomeadamente a penicilina (Peraica et al., 1999; Quillien, 2002).

1.2 MICOTOXINAS

Etimologicamente o termo **MICOTOXINA** combina a palavra grega “*Mykes*” que significa fungo com o termo do latim, “*toxicum*” que quer dizer, veneno (toxina) (Bullerman citado em Gonzalez et al., 2001).

A estrutura química das micotoxinas varia consideravelmente mas são compostos biológicos naturais de baixo peso molecular, normalmente tóxicos, produzidos pelo metabolismo secundário de fungos, nomeadamente e mais frequentemente pelos géneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillum*.

As micotoxinas contaminam uma grande variedade de produtos alimentares (essencialmente agrícolas), nalguns casos, com consequências graves para a saúde humana e dos animais. Estas consequências podem ser ao nível sanitário, económico (só em 1998 o prejuízo resultante da rejeição de cereais (milho) representou cerca de 97 milhões de euros) e de natureza social. Ou como mais recentemente foi definido por Pitt; micotoxinas são “metabolitos fúngicos cuja ingestão, inalação ou absorção cutânea reduz a actividade, causa enfermidades ou mesmo a morte de animais (não excluindo as aves) e seres humanos” (in <http://www.fao.org/docrep/005/y1390e/y1390e02.htm#bm02x>).

Assim, nesta dissertação o termo **micotoxinas** é entendido como “compostos biológicos naturais (de baixo peso molecular) produzidos pelo metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos, nomeadamente e mais frequentemente pelos géneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillum* que se desenvolvem numa grande variedade de produtos alimentares, nomeadamente plantas de grande importância na agricultura, como são o milho e outros cereais, a semente de algodão, as especiarias e plantas medicinais. Algumas micotoxinas apresentam reconhecida actividade tóxica em animais (não excluindo as aves) e seres humanos, afectando principalmente o fígado, os rins e os sistemas nervoso, endócrino e imunitário, pelo que são consideradas carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas e ou com actividade imunossupressora”.

Como se tratam de contaminantes naturais, não é possível eliminar por completo a sua presença dos alimentos, o que torna imperativo o acompanhamento constante dos produtos destinados ao consumo humano ou animal devendo a sua presença ser reduzida a níveis que não apresentem risco para os consumidores. Actualmente encontram-se identificadas entre 300 a 400 micotoxinas. Só para se ter uma ideia, a mesma estirpe de *Fusarium* pode produzir até 17 micotoxinas diferentes.

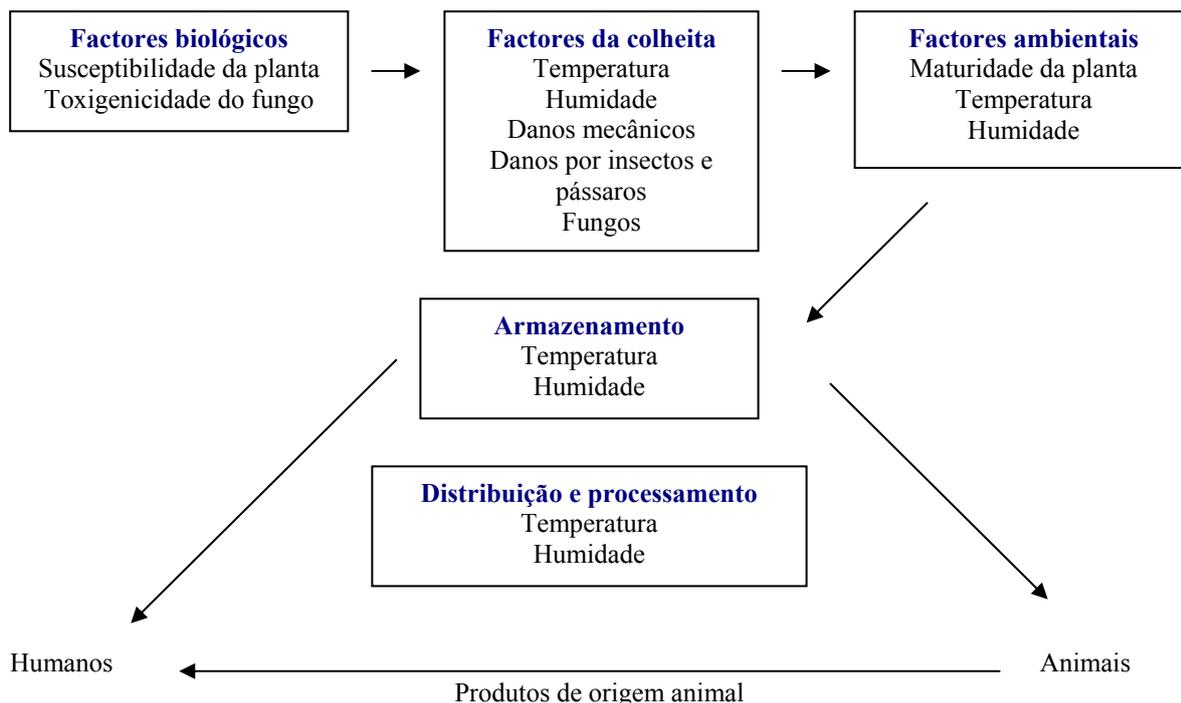
Várias micotoxinas foram classificadas pelo IARC, como carcinogénicos humanos ou potenciais carcinogénicos humanos (IARC, 1993).

A principal via de exposição às micotoxinas é através da ingestão de alimentos contaminados, apesar de existirem casos esporádicos de inalação de micotoxinas e contacto dermal. Quando presentes em níveis elevados na dieta alimentar, podem conduzir a problemas agudos de saúde e no limite, levar até à morte.

Existe uma série de factores biológicos que contribui para a ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar, com ênfase para a susceptibilidade dos vegetais à infecção fúngica, tanto no campo como durante o armazenamento, assim como factores ambientais tais como a temperatura, humidade e danos mecânicos durante a colheita e armazenamento (Figura 1.1). Para além disso, a contaminação dos animais através da ração pode trazer graves consequências, uma vez que aquela não é, na generalidade, visível a olho nu pelo que as micotoxinas passam para o leite, ovos e carne, colocando em risco todos os consumidores. Desta forma, o controlo dos níveis de contaminação dos alimentos nas diferentes etapas (produção, armazenamento e processamento) torna-se essencial para evitar as consequências nefastas de uma eventual contaminação.

Somam-se ainda os problemas resultantes do incremento da comercialização internacional de alimentos, que exige o armazenamento dos produtos nos períodos entre colheitas em condições que podem favorecer o desenvolvimento de fungos, das transformações dos hábitos alimentares e de consumo, bem como os avanços tecnológicos na refrigeração que podem promover o crescimento de fungos psicotróficos (Ross et al., 1998).

Figura 1.1 - Factores que contribuem para a ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar



(Adaptado de J.E.Smith, G.L.Solomons, C.W.Lewis e J.G.Anderson (1994). Mycotoxins in human nutrition and health. Comissão Europeia DG XII). In Chapter 2 - Foodborne hazards. Basic Food safety for healthy workers)

Os principais efeitos observados nas diferentes micotoxicoses incluem inapetência, atraso no crescimento, encefalopatias, cirrose hepática, hepatocarcinogénese, hemorragias intestinais, degenerescências (degeneração gorda do fígado) e incidências ao nível do rendimento animal, tais como a diminuição da taxa de crescimento, problemas associados à imunossupressão e os síndromes de “*Kwashiorkor*” e de “*Reye*”, entre outros (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Algumas micotoxinas, seus fungos produtores, seus efeitos tóxicos e substratos de contaminação (Delgadillo e Nunes, 1997)

Toxina	Tipo Composto Químico	Fungo produtor	Efeito tóxico	Alimento
Aflatoxina	Cumarina substituída	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , e alguns <i>Penicillium</i>	Hepatocarcinogénica, hepatotóxica e tetratogénica (Síndromes de Reye e Kweshiorkor)	Cevada, trigo, amendoim, sorgo, manteiga de amendoim, molho de soja, esparguete, batata doce, farinha, óleos
Desoxinivalenol (Vomitoxina)	Sesquiterpeno tetracíclico	<i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp.	Emética	Cereais
Fuminisinas	Diéster do ácido propano-1,2,3-tricarboxílico	<i>F. verticilloides</i> (antes conhecida como <i>F. moniliforme</i>), <i>F. proliferatum</i>	Leucoencefalomalácia nos cavalos; edema pulmonar em porcos e hepatocarcinomas em ratazanas	Milho e produtos derivados
Ocratoxina A	Isocumarina	<i>Aspergillus ostianus</i> , <i>A. petrakii</i> , <i>A. aliaceus</i> , <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. maleus</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. viridicatum</i>	Nefrotóxica	Trigo, cevada, aveia, arroz, soja, amendoins, massa, pão, ovos, rins de porco, coração, fígado, carne de galinha
Patulina	Lactona	<i>Penicillium expansum</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. patulum</i> , <i>P. melinii</i> , <i>P. leucoppus</i> , <i>P. urticae</i> , <i>P. equinum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. gigantus</i> , <i>A. terreus</i>	Hemorragias pulmonares e cerebrais, possivelmente neurotóxica	Sementes em germinação e maçãs
Toxina T-2	Sesquiterpeno tetracíclico	<i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp.	Dermatotóxica e emética	Cereais
Zealarenona	Lactona macrocíclica	<i>Fusarium graminearium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Absidia</i>	Estrogénica	Milho armazenado durante longos períodos de tempo
Alcalóides do tipo Ergot	Alcalóide	<i>Claviceps purpurea</i>	Neurotóxica (alucinogénica)	Cereais
Citrinina	Lactona macrocíclica	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. viridicatum</i>	Nefrotóxica	Frutos secos, arroz, cereais, cevada, trigo
Esterigmatocistina	Xantona substituída	<i>Aspergillus reguloso</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. versicillor</i> , <i>Penicillium luteum</i>	Hepatocarcinogénica, hepatotóxica	Cevada e aveia
Ácido ciclopiazónico	Derivado indólico policíclico	<i>Penicillium cyclopium</i>	Neurotóxica (efeito convulsivo e tremorgénico), nefrotóxica	Cevada

Toxina	Tipo Composto Químico	Fungo produtor	Efeito tóxico	Alimento
Ácido penicílico	Lactona α,β insaturada (5 membros)	<i>Penicillium puberulum</i> , <i>P. cyclosporium</i> , <i>P. maritimum</i> , <i>P. thomii</i> , <i>P. suavelens</i> , <i>P. marditti</i> , <i>P. P. baarnense</i> , <i>Aspergillus quercinus</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. ochraceus</i>	Carcinogénico cardiotoxíco	Grãos secos e aveia
Austriol	Lactona macrocíclica	<i>Aspergillus ustus</i>	Gastro-enterotoxigénica (ulcerogénica)	Cevada húmida
Aversina	Antraquinona substituída	<i>Aspergillus versicolor</i>	Hepatotóxica	Grãos de cereais e sementes oleaginosas
Citreoviridina	Lactona α,β insaturada (6 membros)	<i>Penicillium citreoviride</i>	Neurotóxica (responsável por paragem respiratória)	Cereais
Esporidesmina	Dipeptídeo cíclico	<i>Pithomyces chartarum</i> , <i>Periconia minutissima</i>	Edema cutâneo por fotosensibilização	Pastagens e forragens
Gliotoxina	Dipeptídeo cíclico	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hemorragias e abortos	Especiarias e cacau
Leuteosquirina	Quinona	<i>Penicillium islandicum</i>	Hepatotóxica, carcinogénica	Massa, arroz, cevada, farinhas
Oosporeina	Quinona	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. galaucus</i> , <i>Penicillium rubrum</i> , <i>P. purpurogenum</i> , <i>Fusarium sporotrichoides</i>	Hemorragias	Farinha e sementes
Penitrem A	Derivado indólico policíclico	<i>Penicillium crustosum</i> , <i>P. granulatum</i>	Neurotóxica (efeito tremorgénico)	Grãos
Psoralenos	Furocumarina fotoactiva	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Dermatotóxica	Plantas
Roquefortina	Dipeptídeo cíclico	<i>Penicillium roqueforti</i>	Neurotoxina	Queijo azul, Roquefort e Stilton
Rubratoxina	Lactona	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. galaucus</i> , <i>Penicillium rubrum</i> , <i>Fusarium sporotrichoides</i>	Teratogénica, hepatotóxica (hemorragias)	Frutos secos e sementes
Rugulosina	Quinona	<i>Penicillium islandicum</i>	Hepatotóxica, nefrotóxica	Arroz, cevada e sorgo
Viridicatina	Derivado de lactamas	<i>Penicillium viridicatum</i>	Cardiotóxica	Cereais

De um modo geral, as micotoxinas apresentam alguns dos seguintes efeitos: teratogénicos, mutagénicos, oncogénicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, estrogénicos, imunotóxicos e alucinogénicos. Várias micotoxinas encontram-se classificadas pelo IARC como carcinogénicos humanos ou potenciais carcinogénicos humanos (IARC, 1993).

A gravidade das enfermidades/micotoxicoses varia em função da natureza da toxina (variabilidade decorrente da própria estrutura química das micotoxinas), das espécies atingidas, uma vez que as diferentes espécies apresentam grande variabilidade em relação à sensibilidade às micotoxinas, da raça (umas são mais resistentes do que outras), da idade e do sexo (os mais jovens e as fêmeas apresentam, normalmente, maior resistência), da condição física, da dose e da exposição (tempo, tipo - via oral ou dérmica) (Peraica et al., 1999; Bennett and Klich, 2003).

As micotoxinas compreendem uma família estruturalmente diversa de mais de 300 compostos de ocorrência natural, muitos dos quais estão presentes como contaminantes naturais em alimentos para humanos e para animais levando a prejuízos económicos substanciais na agricultura como mencionado anteriormente. No entanto, o número de micotoxinas que são detectadas e analisadas com frequência nos géneros alimentícios é relativamente pequeno, cifrando-se entre as 20 e as 30 (Bennett and Klich, 2003).

Na **Tabela 1.2** são apresentadas as micotoxinas mais importantes do ponto de vista agro-alimentar: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, patulina, tricotecenos e zearalenona.

Tabela 1.2 - Toxinas produzidas por diferentes géneros de fungos na natureza
(Guzmán-de-Peña, 2001)

Géneros		
<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
Micotoxinas		
Aflatoxinas (AFs)	Fumonisinias	Ocratoxina A (OTA)
Ocratoxina A (OTA)	Tricotecenos	Patulina (PAT)
	Zearalenona (ZEA)	

Embora estejam estabelecidas rigorosas directrizes para a gestão preventiva de micotoxinas em colheitas (i.e., práticas recomendadas para o cultivo, colheita, manipulação e armazenamento), podem subsistir contaminações significativas de micotoxinas.

Consequentemente, há um aumento na tomada de consciência dos perigos potenciais destas substâncias como contaminantes de alimentos e rações. Comumente, as micotoxinas ocorrem como misturas que potencialmente podem provocar interacções complexas e sinergias tóxicas, como será abordado posteriormente.

A presença de fungos toxigénicos não pressupõe por si só a produção de micotoxina(s), pois esta depende de algumas condições favoráveis em termos de temperatura e humidade. No entanto a presença de certos fungos implica um risco potencial para a saúde pública e animal (Martins et al., 2003).

A detecção de micotoxinas está documentada em várias matrizes alimentares, sendo regularmente encontradas em ingredientes para rações tais como milho, sorgo, cevada, trigo, arroz, amendoins e outros cereais, matrizes de origem animal, como por exemplo, carne, órgãos viscerais, leite (devido à excreção de metabolitos pelas glândulas mamárias), queijo e ovos, enchidos maturados, preparados para infusões, especiarias, frutos frescos, frutos secos (amendoins, pistácios) e secados (passas de uva, sultanas, alperces). Por outro lado, a compreensão da extensão da acumulação de micotoxinas nos peixes devido ao consumo de rações contaminadas é ainda insuficiente. (FAO, 2002).

A presença simultânea de diversas micotoxinas pode influir tanto a nível de produção de micotoxinas como na toxicidade do material contaminado. Tem sido relatado que a presença de tricotecenos pode favorecer a produção das aflatoxinas nos cereais armazenados. Estes investigadores também referem que existem interacções sinérgicas que determinam, em animais de experimentação, efeitos toxicológicos resultantes de combinações de tricotecenos produzidas de forma natural. Por exemplo, a produção de aflatoxinas pode ser favorecida pela presença de tricotecenos. Num estudo com porcos, a toxina T-2 demonstrou efeitos sinérgicos com o desoxinivalenol nas taxas de engorda e de conversão de ensilagens (in http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/005/y1390e/y1390e05.htm).

Também têm sido indicadas interações nas quais intervêm metabolitos fúngicos não tóxicos (como por exemplo, a potente acção sinérgica do desoxinivalenol) com metabolitos não tóxicos de *F. graminearum* (culmorina, dihidroxicalonectrina e sambucinol). No entanto, os conhecimentos existentes até à data relativamente a este campo, particularmente importante da micotoxicologia, são ainda escassos (*in* http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/005/y1390e/y1390e05.htm).

Por outro lado, a preocupação com a presença de micotoxinas nos alimentos e as suas implicações na saúde humana e ou animal, aumentou à medida que novas micotoxinas iam sendo identificadas. Assim pela compilação de dados sobre a sua ocorrência natural em alimentos e sobre a respectiva toxicidade em animais, para além dos casos de micotoxicoses agudas, passou-se a dar importância também aos possíveis efeitos crónicos resultantes da ingestão regular (e ou continuada) de micotoxinas.

Uma micotoxicose primária resulta do consumo de alimentos contaminados enquanto que uma micotoxicose secundária resulta da ingestão de carne ou produtos derivados (por exemplo, leite) de animais que foram alimentados com rações contaminadas com micotoxinas. Pode-se também falar de micotoxicoses agudas e crónicas, resultante respectivamente da ingestão de doses elevadas ou doses pequenas ao longo do tempo.

Um exemplo típico deste último caso é o leite de vaca que aparece contaminado com Aflatoxina M1 (AFM1) como consequência da ingestão por parte da vaca leiteira de rações contaminadas com Aflatoxina B1 (AFB1), um potente agente hepatocarcinogénico, em experiências com animais (Carrillo, 2003).

A exposição humana a micotoxinas resultante da ingestão de alimentos contaminados pode ser considerada uma questão de saúde pública pois sabe-se que cerca de 25% dos produtos agrícolas produzidos a nível mundial e que entram na cadeia alimentar animal e humana (principalmente cereais e sementes de oleaginosas) estão contaminados com micotoxinas (Caldas et al., 2002).

É possível encontrar ao longo da história, referências a acontecimentos que traduzem manifestações da ocorrência de casos de intoxicação provocadas pela presença de micotoxinas nos alimentos. “Muitos dos mitos que povoam a idade das trevas estão relacionados com a existência de micotoxinas nos alimentos” – Mary Matossian (historiadora). Um exemplo, é o da peste bubónica (1348-1352) que dizimou num curto espaço de tempo, cerca de um terço da população europeia (*in* <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong/BOT135/lect11.htm>).

Para além da referência histórica aos assassinatos perpetrados pela mãe de Nero, recorrendo a cogumelos tóxicos (provavelmente o mais antigo testemunho dos malefícios associados à ingestão de micotoxinas), é possível encontrar documentos da Idade Média onde são relatados casos de ergotismo.

Uma das primeiras ocorrências com influências graves na saúde humana aconteceu nos finais do primeiro milénio, em que crónicas religiosas dessa época relatam epidemias de um mal designado por "fogo de Santo António" (*St. Antony's fire*). As vítimas, muitas delas de visita ao santuário de *St. Anthony* em França na esperança de serem curadas, sentiam uma sensação de queimadura e sofriam de alucinações e outras perturbações mentais, acabando por morrer.

...“*Wailing and writhing men collapsed in the street: others fell over and foamed in epileptic fits whilst some vomited and showed signs of insanity. Many of them shouted “Fire! I’m burning”. It was an invisible fire that separated the flesh from the bones and consumed it. Men, women and children died in unbearable agonising pain.*”...

Estas foram as palavras usadas por um cronista do século décimo para descrever uma doença que afectou muitas partes da Europa em 943 D.C. Sabe-se agora que o fogo de Santo António tratou-se na realidade de um caso de ergotismo, doença causada pela ingestão de grãos de cereais (centeio, cevada, arroz, trigo) contaminados com alcalóides de Ergot produzidos por fungos do género *Claviceps* (*purpureae*, *paspali* e *fusiformis*) e que tomou proporções epidémicas em muitas partes da Europa no séc. X (*in* http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/005/y1390e/y1390e02.htm).

Na última metade do século XIX (1891), no Japão, certas manifestações clínicas agudas foram associadas ao consumo de arroz contaminado por fungos. Um médico japonês associou a ingestão de arroz contaminado com bolor ao desenvolvimento de um tipo agudo de beribéri cardíaco (resultante da acção da citreoviridina). Contudo à medida que a qualidade do arroz foi sendo melhorada a doença tornou-se menos comum e acabou por desaparecer. Estes agentes invadem o hospedeiro, formando potentes alcalóides que produzem nos seres humanos graves micotoxicoses, caracterizadas por desordens do sistema nervoso (convulsões e alucinações), contracção dos vasos sanguíneos (gangrena) e desordens gastro-intestinais.

Em 1975, na Índia, 272 pessoas deram entrada num hospital com sintomas clínicos de aflatoxicoses, dos quais 27% morreram. Em 1981, em África, em Moçambique e no Quênia, ocorreram 20 hospitalizações, dos quais 60% morreram (Krishnamachari et al.; Mehan et al.; Nagindu, et al.; Marasas citados em <http://www.ifpri.org/themes/grp06/papers/cardwell.pdf>). Na Rússia e na Europa de Leste, durante a 1ª e 2ª Guerras Mundiais, apareceu uma doença associada ao sistema hematopoiético. Milhares de pessoas foram afectadas por este síndrome e as taxas de mortalidade atingiram os 60%. Os sintomas incluíam extrema anemia, hemorragias severas e perda de medula óssea. A doença foi denominada aleucémia tóxica alimentar (ATA). Numerosos estudos realizados, indicaram que a toxicose resultava da ingestão de milho contaminado com fungos do género *Fusarium*. Sabe-se hoje que o *Fusarium* produz um grande número de micotoxinas do tipo dos tricotecenos e, com base nos efeitos tóxicos destes compostos, pensa-se que certos tricotecenos, como a toxina T-2, serão os agentes da ATA.

Nos anos 50, uma doença conhecida como nefropatia endémica dos Balcãs (BEN) surgiu nas áreas rurais da Bulgária, Roménia e Jugoslávia, causando uma mortalidade superior a 40%. Os principais sintomas da doença eram uma intensa nefropatia, muitas vezes acompanhada por tumores do tracto urinário. Baseada na similaridade da patologia renal de porcos expostos à ocratoxina A, foi sugerido ser este o agente causal daquela doença. Estudos recentes, efectuados em áreas endémicas da antiga Jugoslávia, mostraram uma maior frequência e uma mais elevada concentração de ocratoxina A em cereais do que em outras áreas (consideradas não endémicas).

A preocupação relativamente aos riscos de exposição humana à ocratoxina A aumentou com a observação da incidência de tumores do tracto urinário em indivíduos com BEN (Petkova-Bocharova et al., 1988). Numerosos estudos publicados mostram claramente que a ocratoxina A é um agente carcinogénico para os mamíferos.

Com a descoberta das aflatoxinas nos anos 60, o estudo das micotoxicoses humanas sofreu uma completa reviravolta. De facto, a morte de cerca de 100 000 perus no Reino Unido, em 1960 pouco antes do Natal, devido a uma doença desconhecida até então, a que se designou por "doença X", foi posteriormente identificada como sendo devida a uma toxina produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, contaminante do bagaço de amendoim proveniente do Brasil (utilizado como fonte proteica em substituição do bagaço de soja, que era mais caro) (Hopmans, 1997).

Posteriormente, em 1961, os investigadores ingleses do *Tropical Products Institut* descobriram que o *Aspergillus flavus* produzia uma substância tóxica a que deram o nome de aflatoxina. A partir de 1962 descobriu-se que a aflatoxina era um potente agente hepatocarcinogéneo para os animais e humanos, o que precipitou os estudos da possível relação entre a exposição à aflatoxina e o cancro humano, conduzindo ao desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis para determinar a aflatoxina e ao controlo desta em alimentos estimulando a investigação científica sobre as micotoxinas (Peraica et al., 1999).

No Homem, o caso mais grave de intoxicação por aflatoxina ocorreu em 1974, na Índia, onde cerca de 25% da população afectada morreu depois de ter ingerido milho contaminado com níveis superiores a 15 mg/kg. Contudo, contaminações com tais níveis, raramente são encontradas.

As aflatoxinas foram propostas como a causa dos desaparecimentos misteriosos das civilizações no sudoeste da América do Sul e na América Central, antes de aparecerem os Europeus (in <http://www.micotoxinas.com.br/boletim27.htm>). Desde a descoberta das aflatoxinas muitos cientistas têm-se dedicado ao estudo das micotoxinas produzidas pelo *Aspergillus flavus* e outras espécies fúngicas, tendo-se identificado, em laboratório, mais de 300 substâncias.

Em particular as aflatoxinas, apresentam uma ameaça significativa tanto para a saúde dos humanos como dos animais, devido ao facto de serem considerados toxigénicos, carcinogénicos, mutagénicos e teratogénicos (Martins et al., 2001), para além dos problemas económicos que poderão daí resultar devido à contaminação natural dos alimentos com consequências a vários níveis, desde o fornecimento sustentável e em quantidade de produtos alimentares ao normal funcionamento dos mercados a nível mundial.

A contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, antes e ou após a colheita e durante o transporte e armazenamento do produto, pelo que são necessárias medidas e práticas de prevenção de modo a minorar os seus efeitos e que serão abordadas no final do capítulo seguinte.

1.3 Sinergismo entre micotoxinas

Quando um alimento ou ração ou até as matérias primas que lhe dão origem se encontra contaminado com mais do que uma micotoxina, os efeitos toxicológicos podem ser sinérgicos, isto é, de adição ou de potenciação (Schwarzer, 2002).

As rações e matérias-primas são frequentemente contaminadas simultaneamente por diversos fungos, em que cada um é capaz de produzir diferentes toxinas. Como tal, poderão existir efeitos sinérgicos entre as diferentes toxinas. Duas ou mais micotoxinas podem potenciar a acção de outra ou pelo menos exercer um efeito aditivo. Por exemplo, o ácido fusárico aumenta a toxicidade da fumonisina em galinhas e aquele do DAS e DON em porcos. As aflatoxinas e a Ocratoxina A, quando juntas nas rações, apresentam uma toxicidade superior do que quando isoladas, podendo provocar nos frangos de aviário, uma perda de peso corporal até cerca de 40%.

No entanto, existe pouca evidência de que as micotoxinas comuns actuam sinérgicamente. Geralmente não é comum a produção de várias micotoxinas no mesmo grão e ao mesmo tempo. A zearalenona e o desoxinivalenol podem produzir-se concomitantemente em milho ou trigo, e em ocasiões circunscritas foram observadas fumonisinas e aflatoxinas.

A combinação de ZEA e ácido fusárico aumenta a concentração de cada um destes compostos por um factor de dois a cinco no leite de ratas. A interacção entre a FB1 e DON aumenta a quantidade de proteína no sangue enquanto que a interacção entre a FB1 e a toxina T-2 leva ao aumento da concentração de cálcio no plasma das galinhas ou a um aumento da concentração de hemoglobina e hematócitos em perus.

Por outro lado, o peso corporal de galinhas é reduzido entre 18 a 20% ingerindo rações contaminadas com 300 mg FB1 por kg de ração durante 20 dias após o nascimento, e o peso corporal é ainda reduzido em 18% quando se adiciona 5 mg de T-2 por kg de ração, em 2% se forem 15 mg de DON, 32% quando são adicionados a FB1 e a toxina T-2 e em 19% pela adição conjunta de FB1 e DON.

Em perus, e nas mesmas condições, 300 mg de FB1 reduziram o ganho de peso entre 24 a 30%, 4 mg de DAS reduziram em 30%, 3 mg de OTA em 8%, uma combinação de FB1 e DAS fizeram-no em 46% e uma mistura de FB1 e OTA reduziu em 37%. Outras combinações, envolvendo o DON e o DAS, ou aflatoxinas e DAS e ainda aflatoxinas e FB1 podem também apresentar efeitos sinérgicos (Yiannikouris and Jouany, 2002).

Um factor comum a muitas espécies de *Fusarium* é a sua capacidade para sintetizar zearalenona e simultaneamente tricotecenos, pelo que se estima que exista um efeito sinérgico aditivo na etiologia das micotoxicoses animais.

O *F. moniliforme* e o *F. proliferatum*, foram vinculados com a contaminação natural do milho com fumonisina B1 e também com a produção de duas micotoxinas relativamente novas, a fusaproliferina e a beauvericina (Ritieni et al., 1997). O metabolismo secundário do *F. moniliforme* é particularmente relevante já que foi associado com a produção de pelo menos três micotoxinas, denominadas fumonisinas, moniliformina e fusarina C. Igualmente se tem descrito as fusarocromanonas como micotoxinas produzidas por algumas espécies de *Fusarium*. O *F. equiseti*, também sintetiza vários tricotecenos assim como a zearalenona (Placinta et al., 1999).

Harvey et al. (1996) demonstraram em estudos realizados com porcos que enquanto o desoxinivalenol e a fumonisina B1 causam individualmente reduções similares mas marginais no ganho de peso, quando se combinam ambas as micotoxinas, verifica-se um fenómeno evidente de sinergismo observado na diminuição do crescimento dos mesmos.

Num ensaio experimental realizado com leitões, o consumo de alimento, o ganho de peso e certos órgãos (fígado e rins) de todos os porcos alimentados com grãos contaminados com diversas micotoxinas (desoxinivalenol, nivalenol, diacetoxiescirpenol, neosolaniol, toxina T-2, toxina HT-2 e zearalenona entre outras), foi significativamente inferior (Swamy et al., 2002). Da mesma maneira, a presença simultânea de zearalenona e desoxinivalenol em alimentos elaborados para porcos e que tinham sido contaminados de forma natural com fungos do género *Fusarium*, produziu malformações nos recém nascidos, tendo tal sido atribuído à dita associação de micotoxinas (Alexopoulos, 2001).

2 MICOTOXINAS

2.1 AFLATOXINAS

2.1.1 Definição e Ocorrência

Embora as maiores concentrações destes compostos surjam nas colheitas de alimentos crescidos e armazenados nas áreas mais quentes do mundo, o comércio internacional destes produtos, importantes para a subsistência das populações, assevera que as aflatoxinas não são apenas um problema para as nações produtoras mas também de preocupação acrescida para os países importadores.

As aflatoxinas constituem um grupo de aproximadamente 20 metabolitos fúngicos relacionados entre si, produzidas por, pelo menos, três espécies de *Aspergillus* - *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (Asao et al. citado em Méndez-Albores et al., 2005) embora somente as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, consideradas metabolitos tóxicos, sejam normalmente encontradas em alimentos.

Encontram-se também descritas as aflatoxinas M1 e M2 que são os metabolitos hidroxilados resultantes do metabolismo oxidativo das aflatoxinas B1 e B2 (Peraica et al., 1999) que ocorre no fígado e são produzidas quando as vacas ou outros ruminantes ingerem rações contaminadas com estas micotoxinas. As AFM1 e AFM2 são então excretadas no leite e podem subsequentemente contaminar outros produtos lácteos tais como o queijo e o iogurte, sendo a maioria (cerca de 95%) excretada na urina. Sabe-se que existe uma relação linear entre a quantidade de AFM1 no leite e de AFB1 nas rações consumidas pelos animais (Dragacci et al.; Wood citados em Kamkar, 2005).

As aflatoxinas são consideradas como contaminantes naturais dos produtos da agricultura, quando as condições de humidade do produto, a humidade relativa do ar e a temperatura ambiente são favoráveis, e de produtos alimentares tais como o amendoim e seus produtos derivados, nomeadamente a manteiga de amendoim e o óleo, sendo estes os principais produtos sujeitos a contaminação elevada de aflatoxinas (Blesa et al., 2003).

A ocorrência das aflatoxinas é muito frequente no amendoim porque as características de cultura, colheita e armazenamento favorecem o desenvolvimento de bolores/fungos. A maior incidência acontece quando o amendoim é batido, ensacado e armazenado com umidade elevada e ou quando é re-humedecido depois de se encontrar no estado seco.

A acumulação da aflatoxina depende das condições climáticas. Antes da colheita, o risco para o desenvolvimento da aflatoxina é maior durante o período de seca. Quando a umidade do solo está abaixo do normal e as temperaturas são elevadas, o número dos esporos do *Aspergillus* no ar aumenta. Estes esporos infectam as colheitas nas áreas danificadas pelos insectos e o tempo austero. Uma vez infectada, ocorre o *stress* da planta e a produção da aflatoxina é favorecida.

Durante o estágio pós-colheita, a proliferação da aflatoxina pode aumentar especialmente nos produtos susceptíveis e sob algumas condições de armazenamento tais como o ambiente quente e húmido do armazenamento.

Além do amendoim, as aflatoxinas podem ocorrer num amplo conjunto de produtos alimentares crus importantes, que incluem os cereais - milho e outros, como trigo e centeio, sementes de algodão e de oleaginosas, figos, nozes, café verde e torrado, especiarias, pó de pimentão, paprica e fruta fresca e ou secada (*Aflatoxins Fact Sheet*), queijo e produtos curados, só para nomear alguns produtos.

2.1.2 Propriedades Químicas e Físicas

As aflatoxinas são substâncias inodoras e cristalinas, solúveis em solventes moderadamente polares tal como o clorofórmio, metanol e dimetil sulfóxido e dissolvem-se em água numa extensão de 10-20 mg/litro. Elas apresentam fluorescência sob a radiação UV, podendo ser facilmente detectadas por fluorodensimetria (pois são fortemente fluorescentes sem qualquer outro tratamento ($\lambda(\text{excitação}) = 365 \text{ nm}$, $\lambda(\text{emissão}) = 430 \text{ nm}$) e são extremamente estáveis na ausência de luz e da radiação UV, até mesmo a temperaturas superiores a 100 °C.

Como atrás mencionado, as aflatoxinas são classificadas em vários sub-tipos. No entanto, as mais importantes são a B1, a B2, a G1 e a G2, distinguidas pela sua cor de fluorescência sob a luz ultravioleta. A aflatoxina B1 foi assim denominada porque era a primeira mancha azul (B1) na placa cromatográfica, enquanto que a primeira mancha esverdeada foi denominada aflatoxina G1.

Portanto, os quatro principais metabolitos são identificados como AFB1 e AFB2, por apresentarem fluorescência azul-violeta quando observadas sob luz ultravioleta em 365 nm e AFG1 e AFG2, por apresentarem fluorescência esverdeada.

Algumas propriedades físicas e químicas importantes das aflatoxinas e respectivos sinónimos são apresentadas na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1 - Propriedades físicas e químicas importantes das aflatoxinas (*Aflatoxin Fact sheet*) e respectivos sinónimos (IARC, 1997)

Aflatoxina	N.º CAS	Formula molecular	Peso molecular	Ponto de fusão	Absorção UV máx (ε), nm, metanol	
					265	360-362
B1	1162-65-8	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	12 400	21 800
6-Metoxidifurocumarona 2,3,6α,9α-Tetrahydro-4-metoxiciclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][l]benzopirano-1,11-diona						
B2	7220-81-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	12 100	24 000
Dihidroaflatoxina B1 2,3,6α,8,9,9α-Hexahidro-4-metoxiciclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][l]benzopirano-1,11-diona						
G1	1165-39-5	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	9 600	17 700
3,4,7α,10α-Tetrahydro-5-metoxi-1H,12H-furo[3',2':4,5]furo[2,3-h]pirano[3,4-c][l]-benzopirano-1,12-diona						
G2	7241-98-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	8 200	17 100
Dihidroaflatoxina G1 3,4,7α,9,10,10α-Hexahidro-5-metoxi-1H,12H-furo[3',2':4,5]furo[2,3-h]pirano[3,4-c][l]-benzopirano-1,12-diona						
M1	6795-23-9	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	14 150	21 250 (357)
4-Hidroxaflatoxina B1 Ciclopenta(c)furo[3',2':4,5]furo[2,3-h]pirano[3,4-c][l]-benzopirano-1,11-diona,2,3,6α,9α-tetrahydro-9a-hidroxi-4-metoxi						
M2	6885-57-0	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	12 100 (264)	22 900 (357)
4-Hidroxaflatoxina B2 Ciclopenta(c)furo[3',2':4,5]furo[2,3-h]pirano[3,4-c][l]-benzopirano-1,11-diona,2,3,6α,8,9,9α-hexahidro-9a-hidroxi-4-metoxi						

O processamento comercial dos produtos crus que fazem uso de procedimentos de purificação incluindo a remoção de partículas quebradas ou danificadas, moagem e selecção, pode reduzir consideravelmente a concentração de aflatoxina.

Quimicamente as aflatoxinas são razoavelmente estáveis em muitos produtos alimentares e algo resistentes à degradação sob procedimentos normais de confecção culinária. É difícil eliminar a aflatoxina uma vez produzida. A eficácia de alguns processos para reduzir as concentrações de aflatoxinas em alimentos pode ser afectada por muitos factores, tais como a presença de proteína, pH, temperatura e extensão do tratamento.

As aflatoxinas são compostos derivados difuranocoumarinas produzidos por uma via policetónica. O anel lactona torna-os susceptíveis à hidrólise alcalina e foram investigados processos que envolvem a amónia ou hipoclorito como meios para a sua remoção dos produtos alimentares, embora as questões que respeitam à toxicidade dos produtos da degradação limitassem o uso destes meios para erradicar as aflatoxinas dos alimentos e rações animais.

Na **Figura 2.1** estão representadas as fórmulas de estrutura de algumas micotoxinas.

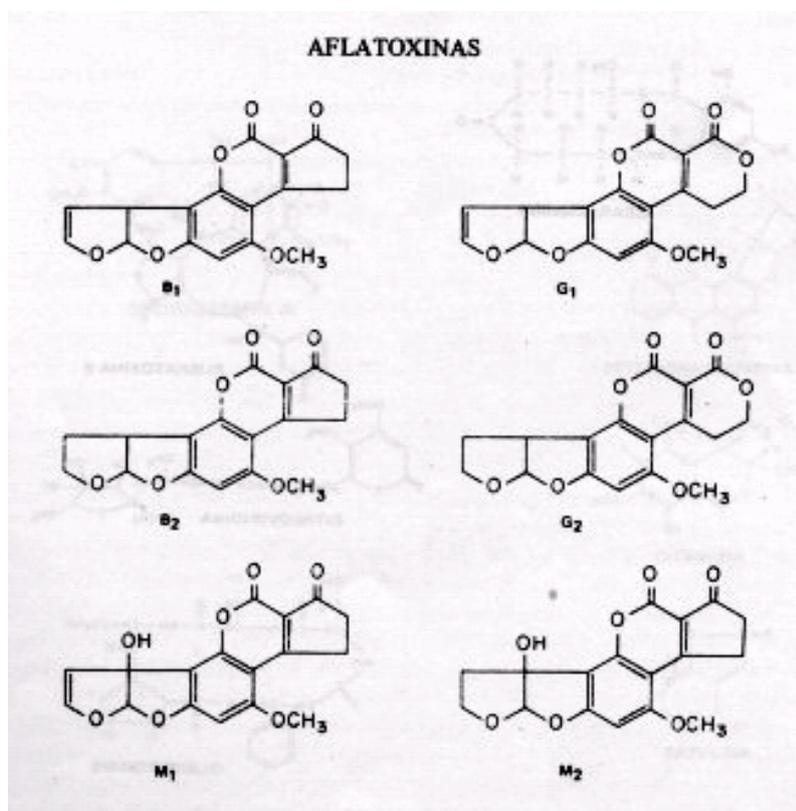


Figura 2.1 - Fórmulas de estrutura de algumas aflatoxinas

Se o tratamento alcalino é suave, a acidificação inverterá a reacção para restaurar a aflatoxina original. Em meio ácido, as aflatoxinas B1 e G1 são convertidas nas aflatoxinas B2 e G2. Os reagentes de oxidação reagem e as moléculas perdem as suas propriedades de fluorescência (in <http://www.micotoxinas.com.br/aflafacts.pdf>).

2.1.3 Aspectos toxicológicos

As aflatoxinas são tanto aguda como cronicamente tóxicas. São provavelmente as micotoxinas mais estudadas, desde a ocorrência da doença denominada *Turkey X* em 1960 no Reino Unido (Bennett and Klich, 2003). A doença foi identificada como sendo não infecciosa e associada com a ingestão de amendoim proveniente do Brasil contendo concentrações extremamente altas de aflatoxinas. As amostras foram enviadas para análise e concluiu-se que a toxicidade estava associada com diversas bandas fluorescentes detectadas por cromatografia de camada fina. Os cientistas concluíram que o amendoim estava contaminado com o fungo *Aspergillus flavus*. As toxinas foram denominadas como aflatoxinas do *Aspergillus flavus*.

Há mais de 30 anos, que se descobriu que as aflatoxinas são poderosos carcinogénicos e mutagénicos em animais de laboratório. A aflatoxina B1 (AFB1), o composto mais tóxico neste grupo, é reconhecida como sendo hepatotóxica, mutagénica, e hepatocarcinogénica (Busby and Wogan citado em Méndez-Albores et al., 2005).

Desde a sua descoberta, numerosas investigações foram conduzidas relativamente aos efeitos tóxicos das aflatoxinas em animais domésticos, com múltiplos problemas de saúde incluindo: dificuldade em sobreviver (vingar), crescimento retardado, ganho de peso mais lento, problemas reprodutivos e respiratórios, diarreia, hemorragia, produção reduzida de leite e de ovos e comprometimento dos sistemas imunológicos com consequente aumento das infecções virais e bacterianas, e mesmo morbidez animal (Newberne and Butler; Guthrie citados em Méndez-Albores et al., 2005).

As aflatoxinas foram implicadas em efeitos sub-agudos e crónicos em seres humanos. Estes efeitos incluem cancro hepático primário (originado no próprio fígado), hepatite crónica, icterícia, hepatomegalia e cirrose através da ingestão repetida de níveis baixos de

aflatoxina. Considera-se também que as aflatoxinas podem ter um papel num certo número de doenças, incluindo o síndrome de *Reye*, de *kwashiorkor* e hepatites e podem também afectar o sistema imunitário (Pier citado em *Aflatoxins Fact sheet*).

De um modo geral pode-se então dizer que as aflatoxinas são compostos altamente tóxicos, mutagénicos, teratogénicos e carcinogénicos e que foram implicados como agentes causadores da carcinogénese hepática e extrahepática humana (Dichter; Groopman et al.; Massey et al.; Peers and Linsell; Shank et al. citados em Kamkar, 2005). Em 1987, a IARC estabeleceu que as aflatoxinas representam um potencial alto risco de cancro para os seres humanos e a AFB1 foi considerada como sendo um carcinogéneo do grupo I (IARC, 1987) e a AFM1 do grupo II (Cathey et al.; Dragacci et al. citados em Kamkar, 2005).

A idade, o sexo e o estado nutricional afectam todos, o grau da toxicidade. Os animais jovens são particularmente susceptíveis e os machos mais do que as fêmeas. O fígado é o principal órgão-alvo, embora o local do efeito hepático varie com a espécie e possa acumular-se no cérebro. Foram também observados efeitos nos pulmões, no miocárdio e nos rins e relatados efeitos teratogénicos após a administração de doses elevadas da aflatoxina em algumas espécies (*in Aflatoxins Fact sheet*).

É aceite que existe uma correlação indirecta entre a ingestão de comida contaminada com aflatoxinas e o desenvolvimento de cancro em pessoas, particularmente em regiões quentes e húmidas tal como África, Índia e alguns outros países asiáticos (Amla et al.; Dvorackova citados em Méndez-Albores et al., 2005).

A aflatoxina B1 é um potente agente mutagénico causando aberrações cromossomais numa variedade de plantas, animais e células humanas. A sua carcinogenicidade foi estudada em pelo menos 12 espécies diferentes. É considerada como sendo o heptocarcinogéneo natural mais potente e sabe-se que mais de metade dos tumores do fígado examinados num estudo efectuado na China, teve o mesmo ponto de mutação no gene p53 no DNA. A aflatoxina B1 forma um aducto com a guanina encontrada no gene p53.

Embora as aflatoxinas G1 e M1 tenham sido testadas menos extensamente, parecem ser toxicologicamente similares à aflatoxina B1. São hepatocarcinogêneos um pouco menos potentes mas carcinogêneos renais ligeiramente mais potentes. A aflatoxina M1 é citotóxica, como foi demonstrado pelos resultados de estudos *in vitro* em hepatócitos humanos, e a sua toxicidade aguda em várias espécies é similar à da aflatoxina B1. A sua ingestão diminui a produção de leite e no caso das aves, a produção e a eclodibilidade dos ovos. Nos patinhos e nos ratinhos, a toxicidade aguda e a curto prazo da aflatoxina M1 foi similar ou ligeiramente menor do que a da aflatoxina B1.

Em estudos de carcinogenicidade, a aflatoxina M1 foi cerca de um décimo tão potente quanto a aflatoxina B1, mesmo em espécies sensíveis tais como a truta de arco-íris e *ratos Fischer*. A genotoxicidade da aflatoxina M1 *in vitro* foi similar à da aflatoxina B1 em alguns sistemas de teste e entre um-meio e um-sexto do que a aflatoxina B1 noutros sistemas.

Considera-se que a carcinogenicidade e a mutagenicidade da aflatoxinas B1, G1 e M1 seja o resultado da formação de um epóxido reactivo na posição 8 e 9 do anel furano terminal e a sua subsequente ligação covalente ao ácido nucleico.

O efeito que a aflatoxina pode causar depende da dose e da frequência com que é ingerida e pode ser agudo (letal ou não) ou subagudo. O efeito agudo é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar o animal à morte, por causa de alterações irreversíveis, e é resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é o resultado da ingestão de doses não elevadas que provoca distúrbios e alterações nos órgãos do Homem e dos animais, especialmente no fígado.

Ambos os casos dependem da espécie animal (umas são mais susceptíveis que outras), da idade (os mais jovens são mais afectados), do estado nutricional e do sexo. No ser humano, em indivíduos nutritivamente comprometidos, i.e., mal nutridos, o valor de 400 ppb é letal. Os cavalos são mortos a um valor de 50 ppb e a truta de arco-íris é a espécie mais sensível pois bastam valores inferiores a 1 ppb para se verificar a ocorrência de tumores do fígado.

A toxicidade crónica faz com que o fígado se torne amarelado, gordo na aparência, e altamente fibroso, sendo as suas funções normais fortemente deterioradas. Sabe-se, também, que ela pode provocar cirrose, necrose do fígado, proliferação dos canais biliares, síndrome de *Reye* (encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragias nos rins e lesões sérias na pele, pelo contacto directo. Além disso, os produtos do seu metabolismo, no organismo, interferem com o sistema imunológico da pessoa ou do animal. Isto faz com que a resistência, às doenças em geral, diminua.

Além dos problemas já citados, já está comprovada a sua relação com a incidência da hepatite B e do síndrome de "*kwashiorkor*". Há, também, o risco do desenvolvimento de cancro primário do fígado. Em países da África e da Ásia, onde se consome, regularmente, alimentos contaminados com aflatoxina, a incidência de cancro no fígado é de, aproximadamente, 13 casos por 100.000 habitantes, por ano.

A aflatoxina B1 é aproximadamente 3 vezes mais tóxica do que a aflatoxina G1, sendo que a susceptibilidade dos animais à aflatoxina B1 pode ser classificada em três níveis, a saber:

- Muito susceptíveis: (DL₅₀ <1 mg/kg peso vivo) trutas, marrequinhos, cobaias, coelhos, cães, gatos e peruzinhos.
- Susceptíveis: (DL₅₀ até 10 mg/kg) porcos, bezerros, pintinhos, frangos, codornas, faisões, vacas, martas, ratos e macacos.
- Pouco susceptíveis: carneiros e camundongos.

Por conseguinte, em relação aos factos toxicológicos pode-se afirmar que:

- Há evidência suficiente da carcinogenicidade de misturas naturais de aflatoxinas e da aflatoxina B1 nos seres humanos.
- Há evidência suficiente da carcinogenicidade de misturas naturais de aflatoxinas e das aflatoxinas B1, G1 e M1 em animais experimentais.
- Há evidência limitada da carcinogenicidade da aflatoxina B2 em animais de laboratório.
- Há evidência inadequada da carcinogenicidade da aflatoxina M1 nos seres humanos.
- Há evidência inadequada da carcinogenicidade da aflatoxina G2 em animais de laboratório.

2.2 MICOTOXINAS produzidas pelo *FUSARIUM*

A. DEFINIÇÃO E OCORRÊNCIA

Os fungos do género *Fusarium* são conhecidos como os microrganismos predominantes, e os mais importantes produtores de várias micotoxinas, comumente encontrados em cereais crescidos nas zonas nórdicas e regiões temperadas e sub-tropicais da América, Europa e da Ásia (Urraca et al., 2005; Wisniewska-Dmytrow et al., 2004; Logrieco et al., 2002).

Uma grande variedade de estirpes de *Fusarium*, fungos que podem ser encontrados no solo, são os contaminantes mais comuns dos cereais e seus produtos, especialmente abundantes no milho.

São conhecidos como produtores de um vasto número de diferentes micotoxinas (**Tabela 2.2**) da classe dos tricotecenos tais como o desoxinivalenol (DON), o nivalenol (NIV), a toxina T-2, o diacetoxiscirpenol (DAS) e também algumas outras toxinas tais como a zearalenona (ZEA) e as fumonisinas B1 e B2 (FB1, FB2) (Wisniewska-Dmytrow et al., 2004; Tanaka et al., 1985).

As espécies de *Fusarium* que causam o apodrecimento do milho, por exemplo, estão disseminadas pelo Mundo e são caracterizadas pela co-ocorrência ou pela sucessão rápida de diferentes espécies, pelo que é comum isolar até nove espécies diferentes de *Fusarium* de uma única semente ou tecido infectado.

Juntamente com o restrito número de espécies toxigénicas que são consideradas patogénicas, existem também algumas espécies de *Fusarium* menos patogénicas ou oportunistas capazes de produzir quantidades consideráveis de toxinas. O perfil toxigénico da colheita contaminada é pois determinada não apenas pela espécie patogénica predominante, mas também pelas espécies oportunistas (Logrieco et al., 2002).

Tabela 2.2 - Espécies micotoxigênicas de *Fusarium* associadas aos cereais e suas micotoxinas
(Logrieco et al., 2002)

Espécies de <i>Fusarium</i> ^a	Micotoxinas ^b
<i>F. acuminatum</i>	T2, MON , HT2, DAS, MAS, NEO, BEA
<i>F. anthophilum</i>	BEA
<i>F. avenaceum</i>	MON, BEA
<i>F. cerealis</i>	NIV, FUS, ZEA , ZOH
<i>F. chlamyosporum</i>	MON
<i>F. culmorum</i>	DON, ZEA, NIV , FUS, ZOH, AcDON
<i>F. equiseti</i>	ZEA, ZOH , MAS, DAS, NIV, DAcNIV, FUS, FUC, BEA
<i>F. graminearum</i>	DON, ZEA, NIV, FUS, AcDON , DAcDON, DAcNIV
<i>F. heterosporum</i>	ZEN , ZOH
<i>F. nygamai</i>	BEA, FB1, FB2
<i>F. oxysporum</i>	MON , BEA
<i>F. poae</i>	DAS, NIV, FUS, MAS, T2, HT2 , NEO, BEA
<i>F. proliferatum</i>	FB1, BEA, MON, FUP , FB2,
<i>F. sambucinum</i>	DAS, T2, NEO, ZEA, MAS , BEA
<i>F. semitectum</i>	ZEA , BEA
<i>F. sporotrichioides</i>	T2, HT2, NEO , MAS, DAS
<i>F. subglutinans</i>	BEA, MON , FUP
<i>F. tricinctum</i>	MON , BEA
<i>F. verticillioides</i>	FB1, FB2, FB3

^aA nomenclatura de *fusarium* de acordo com Nelson et al. (1983). ^bAs letras a *bold* indicam as micotoxinas mais importantes.

Abreviaturas:

AcDON – Mono-acetildesoxinivalenóis (3-AcDON, 15-AcDON); AcNIV – Monoacetilnivalenol (15-AcNIV); BEA – Beauvericina; DiAcDON – Di-acetildesoxinivalenol (3,15-AcDON); DAcNIV – Diacetilnivalenol (4,15-AcNIV); DAS – Diacetoxiscirpenol; DON – Desoxinivalenol (Vomitoxina); FB1 – Fumonissina B1; FB2 – Fumonissina B2; FB3 – Fumonissina B3; FUP – Fusaproliferina; FUS – Fusarenona-X (4-Acetil-NIV); FUC – Fusarocromanona; HT2 – toxina HT-2; MAS – Monoacetoxiscirpenol; MON – Moniliformina; NEO – Neosolaniol; NIV – Nivalenol; T2 – toxina T-2; ZEA – Zearalenona; ZOH – zearalenóis (isômeros α e β).

B. PROPRIEDADES QUÍMICAS E FÍSICAS

As toxinas de *Fusarium* apresentam estruturas muito diversas pelo que serão apresentadas à medida que forem sendo enumeradas nas páginas seguintes.

C. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

As toxinas de *Fusarium* demonstraram causar uma variedade de efeitos tóxicos em gado, e em algumas ocasiões, estiveram associados e ou sob suspeita de causar toxicidade em humanos (Urraca et al., 2005). Várias “fusariotoxicoses” são conhecidas em medicina veterinária. De entre elas pode-se destacar a toxicose por tricotecenos, o síndrome da zearalenona, a leucoencefalomalacia equina, o edema pulmonar suíno e o síndrome do raquitismo das aves domésticas, que são maioritariamente causadas pelos tricotecenos, zearalenona e fumonissinas respectivamente.

Isto faz com que a contaminação dos cereais por toxinas de *Fusarium* conduza a grandes perdas económicas a nível mundial, como resultado da diminuição da produção animal e seus produtos.

2.2.1 FUMONISINAS

2.2.1.1 Definição e Ocorrência

As fumonisinas (**Figura 2.2**) foram isoladas e caracterizadas pela primeira vez em 1988 pelo chamado “grupo de Marasas” a partir de culturas de *Fusarium verticillioides* estirpe MRC 826 no âmbito do *Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis* (PROMEC) do *Medical Research Council* (MRC) em Tygerberg, África do Sul, por Gelderblom et al. em 1988 (Tseng and Liu, 1997; Marasas, 2001; Bennett and Klich, 2003).

São metabolitos secundários fúngicos, constituindo uma família de toxinas naturais carcinogénicas encontrada nos alimentos, sendo produzidos por *Alternaria alternata f. sp. lycopersici* e por várias espécies do género *Fusarium* (Bennett and Klich, 2003), principalmente *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. antes conhecida como *F. moniliforme* = *Gibberella fujikuroi*, uma espécie bem adaptada a climas tropicais e subtropicais (Gelderblom et al.; Bezuidenhout et al. citados em Pozzi et al., 2002).

Outras espécies de *Fusarium* são também produtoras de fumonisinas: *Fusarium proliferatum*, *F. nygamai*, *F. anthophilum*, *F. napiforme*, *F. dlamini*, *F. globosum*, *F. subglutinans*, *F. polyphialidicum*, *F. oxysporum* (Pozzi et al., 2002; Hinojo et al., 2006).

Foram descritas quatro séries de fumonisinas, e nomeadas por A, B, C e P. As da série B incluem as fumonisinas mais activas, particularmente a FB1 que tem causado grandes preocupações, sendo dada maior atenção às fumonisinas B1 (FB1) e B2 (FB2), pouco se conhecendo acerca da ocorrência das fumonisinas B3 e B4 (Pozzi et al., 2002).

Há poucas informações sobre exposição humana à FB1. Para os Estados Unidos estima-se uma exposição de 0,08 µg/kg peso corporal/dia e na Suíça de 0,03 µg/kg peso corporal/dia. Na Holanda a exposição varia entre 0,006 a 7,1 µg/kg peso corporal/dia e na África do Sul de 14 a 440 µg/kg peso corporal/dia (SCF 2000).

2.2.1.2 Propriedades Químicas e Físicas

As fumonisinas são moléculas estruturalmente relacionadas, tendo já sido isoladas e caracterizadas 16 - FB1, FB2, FB3, FB4, A1, A2, A3, AK1, C1, C3, C4, P1, P2, P3, PH1a, PH1b. As análises de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa revelaram que a FB1 é um diéster do ácido propano-1,2,3-tricarboxílico e 2S-amino-12S, 16R-dimetil-3S,5R,10R,14S,15R-pentahidroxicosano em que nos C14 e C15, os grupos hidroxilos são esterificados com o grupo carboxilo terminal do ácido propano-1,2,3-tricarboxílico (Musser and Plattner; Ah-Seo and Won Lee; Bezuidenhout et al. citados em Pozzi et al., 2002).

As estruturas químicas das fumonisinas B1 a B4 (FB1-FB₄) são apresentadas na **Figura 2.3**. A suas estruturas são basedas numa cadeia hidrocarbonada hidroxilada longa (pentahidroxieicosano) contendo grupos metilo e também grupos amino (B1 e B2) ou grupos acetil amino (A1 e A2). Dois grupos hidroxilos estão esterificados por duas moléculas de ácido propano-1,2,3-tricarboxílico, trivialmente chamado de ácido tricarbálico. A FB1 difere da FB2 uma vez que esta não apresenta o grupo hidroxilo em C10 e a FB3 não apresenta o grupo -OH em C5.

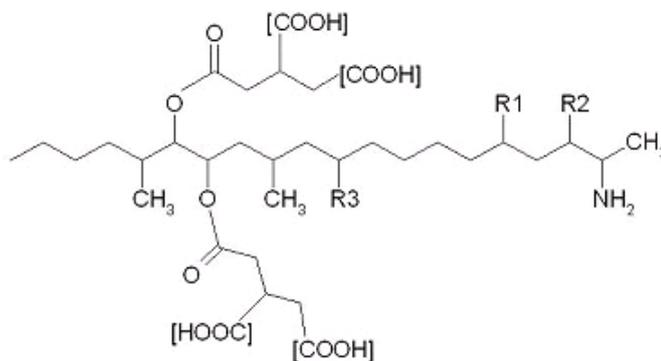


Figura 2.3 - Fórmula estrutural das fumonisinas B1-B4:

Fumonisina B1: R1= OH; R2= OH; R3= OH;
 Fumonisina B2: R1= H; R2= OH; R3= OH;
 Fumonisina B3: R1= OH; R2= OH; R3= H;
 Fumonisina B4: R1= H; R2= OH; R3= H

A FB1 pode constituir mais do que 70% de todas as fumonisinas presentes nos alimentos e é a causa mais frequente das toxicoses ocasionadas por fumonisinas em animais. As fumonisinas FB2 a FB4 apresentam padrões diferentes de hidroxilação.

As fumonisinas B3 e B4, bem como os seus produtos de hidrólise (série “HB”), foram caracterizadas por [Cawood et al.](#), as estruturas químicas das fumonisinas da série A, que são n-acetildas, foram elucidadas por [Bezuidenhout et al.](#) e as da série C, quimicamente semelhantes à série B, excepto no facto de não possuírem o grupo metilo terminal em C1, por [Branham and Plattner](#) (citados em [Pozzi et al., 2002](#)).

As fumonisinas são moléculas fortemente polares, solúveis em água e em acetonitrilo-água e insolúveis em solventes orgânicos. A hidrólise das fumonisinas, através do aquecimento com ácido hidrocloreico 6M ou hidróxido de potássio 0,05 e 2M produz ácido tricarbóxico e o aminopoliol correspondente ([Scott](#) citado em [Pozzi et al., 2002](#)).

Os números CAS e os pesos moleculares das quatro fumonisinas são apresentados na **Tabela 2.3**. Por causa dos quatro grupos carboxilo livres e do grupo amina, estes compostos são solúveis em água, mas não são solúveis em solventes orgânicos não polares ([Dutton, 1996](#)).

Tabela 2.3 - Os números CAS e os pesos molares das FB1 – FB4

	Fórmula	Número CAS	Peso molecular (g/mol)
FB1	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	116355-83-0	721.8
FB2	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	116355-84-1	705.8
FB3	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	136379-59-4	705.8
FB4	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₃	136379-60-7	689.8

2.2.1.3 Aspectos toxicológicos

Nos seres humanos, existe uma provável ligação com o cancro do esófago. Estudos epidemiológicos associaram o consumo de alimentos contaminados com *Fusarium* e a alta incidência de cancro do esófago em regiões do Transkei (África do Sul), China e nordeste de Itália ([Bennett and Klich, 2003](#)).

As fumonisinas afectam os animais de diferentes modos interferindo com o metabolismo esfingolípido. A fumonisina B1 (FB1) é considerada como sendo a mais tóxica destes compostos, é produzida em grandes quantidades e considerada responsável por várias toxicoses em animais domésticos. No entanto, o JECFA estabeleceu o perfil toxicológico da fumonisina B2 e da fumonisina B3 como sendo muito semelhantes ao da fumonisina B1 (in http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out185_en.pdf).

Foi identificada como sendo o agente causador da doença de leucoencefalomalacia equina (ELEM), do edema pulmonar e hidrotórax (derrame pleural) para além de outros síndromes hepáticos em suínos, diarreia e peso corporal reduzido dos pintos/pintainhos e hepatocarcinomas em ratazanas. Foi também implicado nas hemorragias cerebrais observadas em coelhos e no aumento de efeitos hepatotóxicos e carcinogénicos bem como de apoptoses no fígado de ratos e carcinogenicidade em ratazanas quando estes eram alimentados com rações contaminadas com a toxina (Camargos et al., 2001).

A FB1 é também considerada como sendo carcinogénica em humanos (IARC classe 2B) e tem sido relacionada com o cancro do esófago humano em áreas da África Austral e China (Prelusky et al.; Li et al.; Yang; Dutton citados em Caloni et al., 2000; Marasas, 2001).

Estas toxinas inibem a ceramida sintase, resultando em distúrbios de processos celulares tais como o crescimento celular, a diferenciação celular, a morfologia celular e apoptoses. O aumento dos apoptoses parece desempenhar um papel importante nos efeitos tóxicos, inclusivamente, na indução de tumores.

O primeiro caso de ELEM foi descrito no Norte de Itália associado à presença de FB1 em alimentos derivados do milho (Caramelli et al. citado em Logrieco et al., 2002). No entanto existe uma primeira descrição desta doença dada por Butler em 1902 (Šegvić and Pepeljnjak, 2001). Outros nomes usaram-se para a descrever: *blind staggers*, *foraging disease*, *corn stalk disease*, *mouldy corn poisoning*, *leucoencephalitis* e *cerebritis* (in <http://www.rencontres-savoir-faire.com/actes/Myco-Lavoisier11.doc>).

Além disso, o milho tratado de forma caseira contaminado com o FB1 foi estatisticamente associado às elevadas taxas de cancro de esófago humano (HEC) em áreas da África Austral, China e sudeste dos EUA. Uma observação similar foi feita em áreas do nordeste da Itália, onde a FB1 foi encontrada na farinha de milho (*polenta*) em concentrações entre 0,15 e 3,76 mg/kg (in <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm>).

A moagem seca do grão de milho resulta geralmente na produção das fracções chamadas farelo, grãos lascados, grãos e farinha. Como as fumonisinas estão concentradas no gérmen e na casca da semente do milho inteiro, a moagem seca produz fracções com diferentes concentrações de fumonisinas. As investigações epidemiológicas e os estudos recentes em animais indicando a carcinogenicidade da fumonisina B1, bem como os efeitos atrás enunciados, realçaram a necessidade de garantir que os produtos alimentares não contenham quantidades excessivas de fumonisinas.

O efeito da temperatura na produção de fumonisinas no arroz é mais relevante do que o efeito da a_w . A acumulação destas micotoxinas foi mais elevada a 20°C e a mais baixa verificou-se a 37°C. Os quatro valores de a_w analisados (0.97, 0.98, 0.99 e 1.0) não afectaram significativamente a acumulação de fumonisina nas culturas de arroz (Hinojo et al., 2006).

Num documento que se supõe fazer parte de uma tese, e que foi possível consultar em http://descargas.cervantesvirtual.com/servlet/SirveObras/35771842214248495222202/002372_2.pdf encontram-se descritas as principais enfermidades relacionadas com a presença de fumonisinas, nomeadamente a ELEM (neurotóxica e hepática), o edema pulmonar suíno, entre outras.

2.2.2 TRICOTECENOS

2.2.2.1 Definição e Ocorrência

Os tricotecenos são metabolitos produzidos por fungos, constituindo uma família muito vasta de substâncias tóxicas naturais, estrutural e quimicamente relacionadas, produzidas por várias espécies de *Fusarium*, nomeadamente pelas espécies *F. sambucinum*, *F. venenatum*, *F. camptoceras*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti* e algumas estirpes de *F. lateritium* e *F. solani* para além de fungos relacionados (*Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Verticimonosporium*, *Cylindrocarpon*) (Desjardins and Proctor; Beremand and McCormick citado em Carrillo, 2003; Hsueh et al., 1999).

Apesar da identificação de mais de 150 tricotecenos, os dados sobre a sua ocorrência natural em produtos alimentares referem-se maioritariamente à toxina T-2, nivalenol (NIV), desoxinivalenol = vomitoxina (DON) e diacetoxiscirpenol = anguidina (DAS) (Pittet et al., 1998). Para além dos fungos de *Fusarium*, outros tricotecenos são também produzidos por fungos dos géneros *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* e *Verticumonosporium* (in <http://www.moldreporter.org/vol2no5/detMac>; Ticha et al. citado em Conková et al., 2003). Atendendo à sua toxicidade, os tricotecenos são classificados como toxinas gastrointestinais, dermatotóxicas, imunotóxicas, hematotóxicas e genotóxicas (Ostrý citado em Conková et al., 2003).

Sendo toxinas produzidas por fungos do género *Fusarium*, e atendendo à toxicidade que lhes está associada, podem causar inúmeros problemas aos animais e ao Homem. As mais comuns são, o desoxinivalenol (DON), também conhecida como vomitoxina, a toxina T-2, o nivalenol, o diacetoxiscirpenol e outras em menor proporção, que ocorrem geralmente em cereais como o milho, trigo, cevada e outros.

Os tricotecenos encontram-se subdivididos em dois grandes grupos; os tricotecenos do tipo A (toxina T2, toxina HT-2, DAS e outras) que não apresenta o grupo carbonilo em C8 e os tricotecenos do tipo B (DON, nivalenol e outros) apresentando um grupo carbonilo em C8.

2.2.2.2 Propriedades Químicas e Físicas

Os tricotecenos formam um largo grupo de sesquiterpenóides produzidos principalmente por diferentes estirpes de *Fusarium*. Cerca de 170 tricotecenos diferentes foram já identificados, mas destes, os contaminantes mais comuns em plantas cultivadas e selvagens são o desoxinivalenol, nivalenol, 3-acetildesoxinivalenol, 15-acetildesoxinivalenol, toxina HT-2 e toxina T-2.

As micotoxinas de tricotecenos são compostos não voláteis, de baixo peso molecular (P.M. 250-550). Este grupo de micotoxinas é relativamente insolúvel em água mas muito solúvel em acetona, acetato de etilo, clorofórmio, sulfóxido de dimetil (DMSO), etanol, metanol e propilenoglicol. São notavelmente estáveis sob diferentes condições ambientais.

A característica química que distingue os tricotecenos é a presença de um anel tricoteceno, que contém uma ligação olefínica (ligação dupla) na posição C-9,10 e um anel epóxido em C-12,13 (*in* <http://www.au.af.mil/au/awc/awcgate/medaspec/Ch-34electrv699.pdf>) para além de um certo número de grupos hidroxilo e acetoxi conforme se pode ver na Figura 2.4.



Figura 2.4 - Estrutura química de alguns tricotecenos

Os tricotecenos purificados geralmente apresentam uma pressão de vapor baixa, mas vaporizam quando aquecidos em solventes orgânicos. A extração de micotoxinas de tricotecenos de culturas fúngicas com solventes orgânicos resulta na formação de um líquido amarelo acastanhado, o qual, depois de evaporado, forma um produto gorduroso cristalino amarelo. Em contraste, toxinas altamente purificadas formam produtos cristalinos brancos, que possuem pontos de fusão característicos (*in* <http://www.au.af.mil/au/awc/awcgate/medaspec/Ch-34electrv699.pdf>).

Todos os tricotecenos contêm um sistema anelar 12,13-epoxi-tricotec-9-eno e podem ser divididos em quatro subgrupos, com os do tipo A e B representando os membros mais importantes. Nos tricotecenos do tipo A, existe um átomo de hidrogênio, um grupo hidroxilo ou um grupo isovaleril na posição C8, enquanto que nos tricotecenos do tipo B existe um grupo cetona na mesma posição (Figura 2.5).

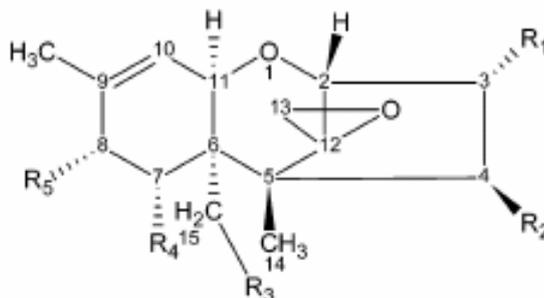


Figura 2.5 - Estruturas dos tricotecenos (Jestoi et al., 2004)

As toxinas T-2 e HT-2 pertencem ao grupo dos tricotecenos do tipo A (**Figura 2.6**) com um grupo oxigênio diferente da função carbonilo na posição do C-8. Os tricotecenos do tipo B (**Figura 2.7**) possuem uma função carbonilo nessa posição.

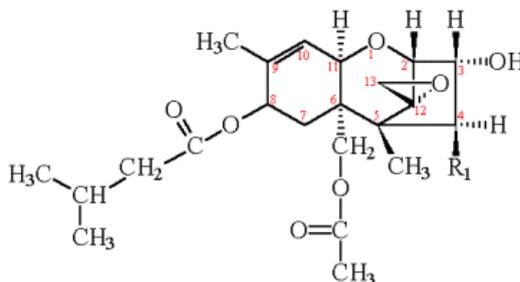


Figura 2.6 - Fórmula estrutural de tricotecenos tipo A

T-2: (R₁ = OAc)

HT-2 (R₁ = OH)

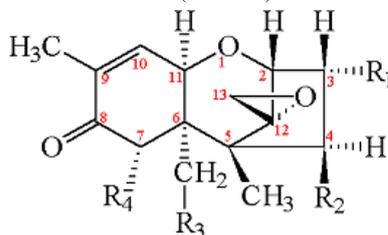


Figura 2.7 - Fórmula estrutural de tricotecenos tipo B

DON (R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = OH)

NIV (R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = OH)

3-AcDON (R₁ = OAc, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = OH)

15-AcDON (R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = OAc, R₄ = OH)

FUS-X (R₁ = OH, R₂ = OAc, R₃ = OH, R₄ = OH)

2.2.2.3 Aspectos toxicológicos

A toxicidade dos tricotecenos em microrganismos, plantas, animais e seres humanos é já conhecida desde há décadas. A sua ocorrência em produtos da agricultura continua a ser um problema mundial (Hsueh et al., 1999). De acordo com a sua toxicidade, os tricotecenos são classificados como toxinas gastrointestinais, dermatotoxinas, imunotoxinas, hematotoxinas e genotoxinas (Ostry citado em Conková et al., 2003).

Muito pouca informação está disponível sobre as sua toxicinética e toxidinâmica nos seres humanos (Sudakin, 2003), no entanto as propriedades toxicodinâmicas dos tricotecenos incluem a inibição de síntese de proteínas e efeitos imunomoduladores.

São potentes agentes tóxicos de células eucarióticas e causam lesões dérmicas (necrose da epiderme), alterações da resposta imunológica, com aumento da susceptibilidade às infecções e inibição da síntese de macromoléculas (RNA e DNA).

A nível celular, os tricotecenos (toxina T-2, toxina HT-2, desoxinivalenol e nivalenol) inibem fortemente a síntese de proteínas por ligação aos ribossomas, provocando danos nas membranas celulares dos glóbulos vermelhos e têm um efeito imunossupresor (Carrilho, 2003).

Podem provocar vômitos, hemorragias, redução do apetite, diminuição do ganho de peso, da produção de ovos, de leite, aleucémia tóxica alimentar (ATA), morte, etc. Outros efeitos observados são o crescimento retardado, a leucopenia, a produção reduzida de anticorpos e problemas no processo de reprodução.

Na **Tabela 2.4** apresentam-se os TDI para os tricotecenos estabelecidos pelo Comité Científico da Alimentação Humana (SCF):

Tabela 2.4 - TDI para os tricotecenos (SCF, Fev. 2002)

Tricotecenos	µg/kg pc/dia
DON	TDI = 1
Nivalenol	t-TDI = 0,7
Toxina T-2, Toxina HT-2; em combinação	t-TDI = 0,06; 0,7

pc = peso corporal, t = temporário

2.2.3 DESOXINIVALENOL

2.2.3.1 Definição e Ocorrência

O desoxinivalenol (DON) (**Figura 2.8**), também chamada de vomitoxina, é uma toxina natural produzida por fungos do género *Fusarium*, principalmente *F. graminearum* e *F. culmorum*, para além de outros, como por exemplo, *F. crookwellense*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. tricinctum* e *F. acuminatum*. Na Europa, esta toxina quimicamente pertencente à família dos tricotecenos é detectada frequentemente em cereais (trigo, milho, cevada, aveia e centeio) (Pittet; Petterson citados em Conková et al., 2003) e grãos processados (malte, cerveja e pão) em todo o mundo (FAO/WHO, 2001; Eriksen and Alexander; Visconti citados em Avantiaggiato et al., 2004).

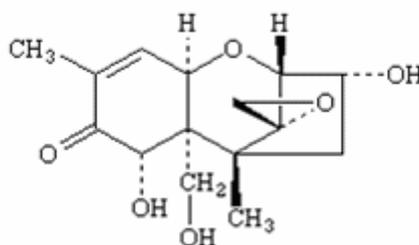


Figura 2.8 - Fórmula estrutural do Desoxinivalenol (Klötzel et al., 2005).

Uma recente compilação de dados sobre a ocorrência de toxinas de *Fusarium* em alimentos na União Europeia mostrou que se tratava de contaminantes frequentes de grãos de cereais tais como aveia (834 amostras, 68% positivas), cevada (1662 amostras, 59% positivas), trigo (11444 amostras, 57% positivas), centeio (295 amostras, 49% positivas), milho (5349 amostras, 41% positivas) e arroz (154 amostras, 27% positivas) por entre as muitas amostras analisadas (SCOOP, 2003).

As concentrações médias nas séries de dados das amostras analisadas em que se provou existir desoxinivalenol, foram avaliadas em 4-760 mg/kg na aveia, 4-9000 mg/kg na cevada, 1-5700 mg/kg no trigo, 13-240 mg/kg no centeio, 3-3700 mg/kg no milho e 6-5100 mg/kg no arroz. Foi também detectado em trigo sarraceno, pipoca, sorgo, triticale e em alguns produtos alimentares processados tais como, farinha de trigo, pão, cereais de pequeno almoço, massas, comidas infantis e panquecas.

O DON e o NIV foram frequentemente encontrados em grãos de cereais e rações animais juntamente com a zearalenona (ZEA). Em cereais contaminados e rações bolorentas, dois derivados, o 3-acetil DON e 15-acetil DON podem estar concomitantemente presentes com o DON em quantidades significativas (10-20%).

Os fungos produtores de tricotecenos são chamados fungos do solo e são microrganismos patogênicos importantes das plantas que se desenvolvem no campo. O DON foi associado a vários efeitos adversos para a saúde humana e animal. Vários incidentes nos EUA resultantes de contaminação com DON levaram a FDA a emitir teores de referência para produtos alimentares (trigo) e rações para animais em 1982, os quais foram actualizados em 1993.

A FDA continua a estudar o alcance e o impacto toxicológico dos problemas com o DON para avaliar a necessidade de medidas regulatórias adicionais para o seu controlo em produtos alimentares e rações para animais.

No entanto, estabeleceu um teor de referência de 1 µg/g (1 ppm) para o desoxinivalenol em produtos de trigo que possam vir a ser consumidos pelos humanos. Não foi estabelecido nenhum teor de referência para o trigo cru destinado a moagem e incluído em produtos alimentares para humanos.

2.2.3.2 Propriedades Químicas e Físicas

O desoxinivalenol tem como sinónimos as seguintes designações: 4-Desoxinivalenol; vomitoxina, dihidronivalenol, RD-toxina ou 12,13-epoxi-3,4,15-trihidroxitricotec-9-en-8-ona, cuja fórmula molecular é $C_{15}H_{20}O_6$ sendo um dos tricotecenos mais polares com um peso molecular de 296,32 e o n.º CAS: 51481-10-8.

Contém um grupo hidroxilo primário e dois secundários, sendo solúvel em água e em solventes polares tais como o metanol e acetonitrilo. Ao contrário de muitos outros tricotecenos, a molécula contém um grupo carbonilo conjugado e isto resulta em alguma absorvância UV que permite a sua detecção por métodos de TLC ou HPLC.

Trata-se de um composto muito estável, tanto durante o armazenamento e moagem como no processamento e cozedura dos alimentos, para além de não se degradar a altas temperaturas (Rotter et al.; Ehling et al.; Eriksen and Alexander *in* http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf).

2.2.3.3 Aspectos toxicológicos

O DON, um tricoteceno citotóxico, foi associado a doenças do fígado, desordens estrogénicas, cancro do esófago e efeitos imunotóxicos (Velluti et al., 2000). A intoxicação com desoxinivalenol (vomitoxina) manifesta-se pela diminuição da ingestão de alimentos ou mesmo a sua recusa, vómitos e desordens digestivas com consequente perda de peso (Ellend citado em Conková et al., 2003). A IARC classificou o DON em 1993 na categoria III, i.e., não classificável quanto à sua carcinogenicidade em pessoas, embora nesse tempo, o estudo crónico negativo em ratos não estivesse disponível (Iversen et al. citado em http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf).

O desoxinivalenol é metabolizado por, e em particular, epoxidação e glucuronidação, geralmente a substâncias menos tóxicas. Pode apresentar efeitos adversos para a saúde após administração aguda, de curto prazo ou a longo prazo em animais experimentais.

Após a administração como uma única dose, o desoxinivalenol apresenta dois efeitos toxicológicos característicos: consumo diminuído da alimentação (anorexia) e vómitos. Ambos os efeitos foram ligados ao aumento da actividade central serotoninérgica. As doses únicas de desoxinivalenol também danificam rapidamente as células em divisão, tal como as que ocorrem no tracto gastrointestinal. Estes efeitos característicos foram também observados com outros tricotecenos, embora se tenham verificado diferenças na potência dos efeitos.

O desoxinivalenol não foi mutagénico para as bactérias, mas foram observadas aberrações cromossómicas tanto *in vitro* como *in vivo*, sugerindo que possa ser genotóxica. No entanto, num único estudo *in vivo* disponível, a maioria das aberrações consistiram em falhas nos cromossomas e a significância total dos resultados foi considerada como podendo ser ambígua (*in* <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm>).

2.2.4 ZEARALENONA

2.2.4.1 Definição e Ocorrência

A zearalenona (ZEA) é um composto uterotrófico e estrogénico não esteroide e é de entre as micotoxinas produzidas por diversas espécies de *Fusarium*, a mais largamente distribuída em produtos agrícolas, sendo encontrada com muita frequência, mesmo em concentrações muito altas, em milho.

A ZEA é um composto estável, tanto durante o armazenamento como no processamento do alimento não se degradando a altas temperaturas. Foi demonstrado poder ser encontrada em quase todo o mundo, num vasto número de cereais tais como, milho, cevada, aveia, trigo, arroz e sorgo expostos à humidade elevada durante o armazenamento e também em pão, sendo produzida no milho por espécies de *Fusarium* nos vários continentes (Austrália, Europa e América do Norte) assim como na Nova Zelândia, Filipinas, Tailândia e Indonésia. A ocorrência da ZEA em alimentos e rações foi também evidenciada na América do Sul, África, Taiwan, China e na antiga U.R.S.S.. *Fusarium isolates* em bananas também podem produzir zearalenona (Kuiper-Goodman et al., Tanaka et al.; Aziz et al., Yamashita et al.; Doko et al.; Ueno et al.; Jiménez et al. citados em <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec14.htm>; Urraca et al., 2005).

Trata-se de uma micotoxina dita de campo, importante nas regiões temperadas e quentes do mundo, tendo sido relatada nos 5 continentes, ocorrendo numa grande variedade de cereais em produtos como o milho, cevada, centeio e trigo. É produzida por algumas espécies de *Fusarium*, principalmente por *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* e *F. semitectum*, espécies que tendem a desenvolver-se particularmente durante as épocas frias, húmidas de crescimento ou da colheita e frequentemente associado ao ZOH (isómeros α - e β -zearalenol) numa grande variedade de cereais principalmente em milho.

Dependendo das condições climáticas, colheita e armazenamento, as concentrações de ZEA encontrada em cereais e produtos cerealíferos variam de menos de 1 até acima de 300 mg/kg, mas raramente excedem os 10 mg/kg (IARC 1993; Avantaggiato et al., 2003).

2.2.4.2 Propriedades Químicas e Físicas

A zearalenona (ZEA) cuja designação química é 6-(10-hidroxi-6-oxo-*trans*-1-undecenil)-beta-resorcíclico-ácido-lactona com o n.º CAS 17924-92-4, é um metabolito secundário fúngico que é predominantemente produzido pelo *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*.

É quimicamente descrito como uma lactona fenólica ácida resorcíclica (Figura 2.9). Apresenta-se com uma cor branca cristalina, exibindo uma fluorescência azul-verde quando excitado pelo comprimento de onda longo sob luz UV (360 nm) e uma fluorescência verde mais intensa quando excitada a um comprimento de onda curto (260 nm).

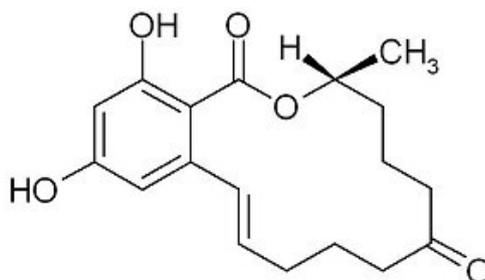


Figura 2.9 – A fórmula de estrutura da zearalenona (Urraca et al., 2005)

Em metanol, os máximos de absorção UV ocorrem a 236 nm ($\epsilon=29,700$), 274 ($\epsilon=13,909$) e 316 nm ($\epsilon=6,020$). A fluorescência máxima em etanol ocorre com irradiação 314 nm e com emissão a 450 nm. A solubilidade em água é cerca de 0.002 g/100 ml. É levemente solúvel em hexano e progressivamente mais solúvel em benzina, acetonitrilo, diclorometano, metanol, etanol e acetona (in <http://www.fermentek.co.il/zearalenone.htm>).

2.2.4.3 Aspectos toxicológicos

A zearalenona é uma lactona macrocíclica, com um forte efeito estrogénico, que tem sido associada a numerosas micotoxicoses em animais, especialmente em porcos, apresentando também propriedades hematotóxicas e genotóxicas (Ostry citado em Conková et al., 2003).

Esta micotoxina causa alterações no tracto reprodutivo de animais de laboratório e domésticos. Além disso, foram observados vários efeitos estrogénicos tais como a fertilidade diminuída, aumento das resorpções fetais e alterações no peso das glândulas endócrinas e dos níveis das hormonas do soro.

O efeito mais importante da zearalenona ocorre no sistema reprodutivo. Esta e alguns dos seus metabolitos ligam-se de forma competitiva aos receptores de estrógenos de vários órgãos (útero, glândula mamária, fígado e hipotálamo) de diferentes espécies animais (Kuiper-Goodman et al., 1987).

Causa hiperestrogenismo, aborto, nados mortos, falso cio, prolapso rectal e da vagina, infertilidade, efeminização dos machos com desenvolvimento de mamas (ela actua como hormona feminina) etc. Devido à sua actividade estrogénica e propriedades anabólicas observadas em suínos, ratinhos e ratazanas, é necessária uma monitorização regular da mesma. A ZEA e os seus derivados são uma importante classe de disruptores endócrinos, que podem causar efeitos estrogénicos e alterações no tracto reprodutivo de animais de laboratório e domésticos (JEFCA 2000).

Em vários estudos, foi demonstrada que a administração oral da toxina a porcas jovens a níveis de alimentação na ordem dos 1-3 mg/kg causava disfunções reprodutivas relacionadas com a dose. Foram relatados casos de vulvovaginites e alterações nos ovários mesmo a níveis mais baixos, e.g., 0.05 mg/kg por 21 dias.

A destoxificação de grãos contaminados com ZEA é difícil de conseguir e presentemente não existe comercialmente nenhum tratamento prático que destrua com eficácia a ZEA. Uma aproximação à desintoxicação da micotoxina envolve a adição à dieta de materiais adsorventes não-nutritivos que se ligam firmemente à micotoxina no tracto gastrointestinal. Esta ligação diminui a biodisponibilidade e toxicidades associadas (Ramos et al.; Visconti; Huwig et al. citados em Avantaggiato et al., 2003).

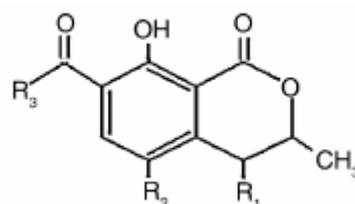
2.3 OCRATOXINAS

2.3.1 Definição e Ocorrência

A ocratoxina A foi inicialmente descoberta em 1965 num *Aspergillus ochraceus* isolate e durante os anos subsequentes, estirpes de 8 espécies de *Aspergillus* (secção *Circumdati*: *A. alutaceus* = *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. melleus* and *A. petrakii*; secção: *Aspergillus*: *A. glaucus*) e várias espécies de *Penicillium*, mostraram ser capazes de produzir esta micotoxina (Ringot et al., 2006; Téren et al., 1996).

Trata-se de uma micotoxina dita de armazenamento e que (como já referido) é produzida por espécies de apenas dois *genera* dos *fungi* *Penicillium* e *Aspergillus* (González-Peñas et al., 2006). Duas espécies de *Penicillium* (*P. verrucosum* e *P. nordicum*), são agora aceites como produtoras de OTA. Alguns membros do grupo *Aspergillus*; *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. terreus* isolates são também relatados como produtores de OTA.

O grupo de metabolitos das ocratoxinas incluem a ocratoxina A (OTA), o seu metil éster e o etil éster, também conhecido por ocratoxina C (OTC), a 4-hidroxiocratoxina A (4-OH OTA), a ocratoxina B (OTB) e seus metil e etil ésteres e a ocratoxina α (OT α), onde falta o grupo funcional fenilalanina (Ringot et al., 2006) cujas estruturas se apresentam na Figura 2.10.



Ocratoxinas	R1	R2	R3
OTA	H	Cl	-NH-CH(COOH)-CH ₂ -fenil
OTB	H	H	-NH-CH(COOH)-CH ₂ -fenil
OTC	H	Cl	-NH-CH(COOC ₂ H ₅)-CH ₂ -fenil
4-OH OTA	OH	Cl	-NH-CH(COOH)-CH ₂ -fenil
OT α	H	Cl	-OH

Figura 2.10 - A estrutura da OTA, OTB, OTC, 4-OH OTA e OT α

É essencialmente um contaminante em cereais (milho, cevada, trigo e aveia) e leguminosas e foi encontrada em tecidos animais edíveis bem como em sangue humano e no leite. A

presença da ocratoxina A foi também observada em feijão, café, vinho, cerveja, sumo de uvas, cacau, frutas secas e especiarias (González-Peñas et al., 2006; Ngundi et al., 2005; Dao et al., 2005). Sabe-se que não é completamente destruída durante o processamento nem cozimento dos produtos alimentares, pelo que deve ser considerada como apresentando implicações e riscos para a segurança e saúde humana (*in* <http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/cp07002.html>).

2.3.2 Propriedades Químicas e Físicas

O termo ocratoxinas enuncia um grupo de metabolitos, contendo estruturas químicas similares, produzidas por estirpes dos géneros *Aspergillus* (*A. ochraceus*) e *Penicillium* (*P. verrucosum*). A mais estudada, tanto pela sua difusão como pela importância toxicológica, é a ocratoxina A (OTA), cuja designação química é R-N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il)carbonil]-fenilalanina (nome IUPAC: 7-(L-β-fenilalanilcarbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocoumarina) (Lo Curto et al., 2004). As propriedades químicas da OTA estão relacionadas com a sua estrutura e por ser um derivado fenilalanil de uma isocoumarina substituída, apresenta uma actividade óptica e uma fluorescência natural (Dall'Asta et al., 2004), cuja estrutura química é apresentada na Figura 2.11.

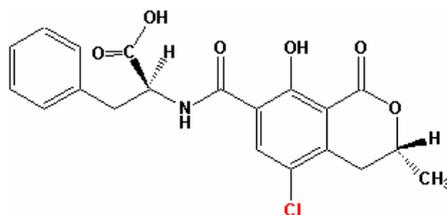


Figura 2.11 – Estrutura química da ocratoxina A (<http://www.biosite.dk/leksikon/ochratoxin.htm>)

A OTA é a mais importante e a que ocorre mais comumente de um grupo de compostos relacionados estruturalmente derivado da família das dihidrocumarinas (Betina citado em Delage et al., 2003), i.e., um derivado do ácido isocumarínico ligado à L-fenilalanina. A ocratoxina A, derivado policétido, consiste numa unidade dihidro-isocumarínica ligada através do grupo carboxilo 12 à fenilalanina. Tem como fórmula molecular: $C_{20}H_{18}ClNO_6$ com peso molecular de 403.81 e n.º CAS 303-47-9.

Existem diversos compostos relacionados com a OTA, tais como a ocratoxina B (que difere da OTA por não possuir o átomo de cloro) e a ocratoxina C, um derivado etil-éster (Figura 2.12). No entanto, a OTA é o principal composto encontrado como contaminante natural do material das plantas. A contaminação com OTA é associada geralmente com os cereais, uvas frescas, fruta secada da videira, vinho, cerveja, café, e cacau.

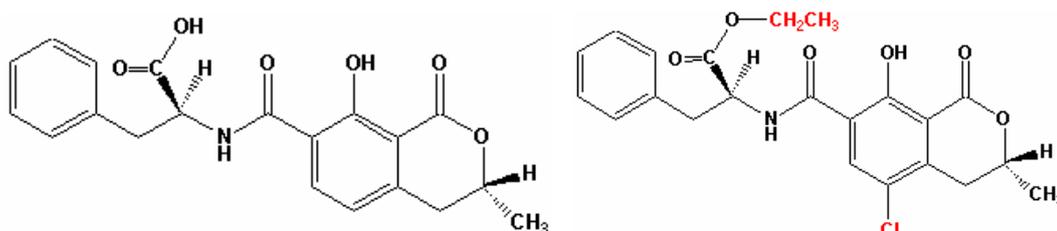


Figura 2.12 - Fórmula estrutural da ocratoxina B e C (<http://www.biosite.dk/leksikon/ochratoxin.htm>)

2.3.3 Aspectos toxicológicos

A OTA é uma micotoxina altamente tóxica que causa intoxicações severas em animais e seres humanos, exibindo ações supressivas sobre o sistema imunitário, causando uma diminuição do nível da imunoglobulina e de outros factores humorais tanto nos ratinhos como nas galinhas para além da redução das respostas das células imunológicas (Lo Curto et al., 2004).

Estudos toxicológicos demonstraram que a OTA é nefrotóxica em todas as espécies animais mamíferas (laboratoriais) estudadas até agora e muito provavelmente para os seres humanos, que apresentam os tempos de meia vida mais longos para a eliminação desta toxina de entre as espécies examinadas.

O seu principal órgão alvo é o túbulo renal proximal, onde exerce os efeitos citotóxicos e carcinogénicos. Foram evidentes as diferenças significativas relacionadas com as espécies e o sexo na sensibilidade à nefrotoxicidade, sendo os porcos os mais sensíveis, seguidos das ratazanas e dos ratinhos. As doses às quais se observaram carcinogenicidade em roedores foram superiores às que causavam nefrotoxicidade.

A ocratoxina A induziu ainda danos no DNA e aberrações cromossomais em células de mamíferos *in vitro* bem como de ratinhos *in vivo*. Como tal, a OTA representa um potente

factor de risco para a saúde humana e a ocorrência desta toxina no vinho é sistematicamente investigada (Delage et al., 2003). Para além de outros efeitos tóxicos para a saúde, a OTA mostrou ser teratogénica, imunotóxica (propriedades imunossupressivas), genotóxica, mutagénica, hepatotóxica e carcinogénica, todos eles conduzindo a patologias perigosas e fatais (Ngundi et al., 2005; Soufleros et al., 2003).

Promove a acumulação de gordura no fígado e sérios danos renais, principalmente em suínos e cachorros sendo, também, a provável causa da Nefropatia Endémica dos Balcãs em humanos. Retarda a maturação sexual em galinhas e diminui a produção de ovos. A exposição humana a OTA pode iniciar-se desde muito cedo, através da ingestão da micotoxina excretada pelo leite materno durante a amamentação.

Na Alemanha (Fink-Gremmels et al., 1995) a concentração de OTA encontrada em amostras de leite humano variaram de 17 a 30 ng/L. Esses valores foram bem maiores na Itália, com valores na ordem de 1700 a 6600 ng/L, ultrapassando a ingestão diária tolerável para adultos.

Na Serra Leoa, 35% das amostras de leite humano analisadas apresentaram teores de OTA em concentrações que variaram entre 0,2 a 337 ng/mL. Também há indícios de contaminação do feto durante a gestação e não se conhecem os efeitos tóxicos da OTA em crianças.

A sua carcinogenicidade foi comprovada em ratinhos e ratazanas pelo que em 1993 a IARC classificou a OTA como potencialmente carcinogénica para o ser humano (Grupo 2B) (Ratola et al., 2004).

A OTA encontra-se classificada como um composto nefrotóxico, hepatotóxico, imunotóxico e teratogénico (Ringot et al., 2006; Dao et al., 2005).

2.4 PATULINA

2.4.1 Definição e Ocorrência

A patulina é uma micotoxina com um historial mais recente, produzida por mais de 60 espécies de fungos principalmente dos géneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*, nos quais se incluem o *Byssochlamys nivea*, *B. fulva*, *Penicillium expansum* (*P. leucopus*), *P. patulum* (*P. urticae*, *P. griseofulvum*), *P. variable*, *P. citeonigrum*, *P. crustosum*, *P. roqueforti*, *P. chrysogenum*, *P. funiculosium* e *P. canescens*, *P. claviforme*, *Paecilomyces spp.*, *Saccharomyces vesicarium*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus giganteus*, *A. terreus* e *A. clavatus* (Moake et al., 2005) sendo as três primeiras consideradas as principais espécies produtoras (Frisvad and Thrane citados em Delage et al., 2003).

Estes fungos podem-se desenvolver numa grande variedade de géneros alimentícios, na maior parte das vezes em fruta, sobretudo em maçãs e produtos derivados por serem as mais susceptíveis e um excelente substrato, sendo portanto a micotoxina mais importante e preocupante nos sumos de fruta (Ross et al., 1998).

Devido à descoberta simultânea deste composto por vários grupos de trabalho, ficou historicamente conhecido por vários nomes tais como clavacina, expansina, claviformina, clavatina, ácido gigantesco e miocina C (Moake et al., 2005).

A patulina foi identificada em maçãs podres contaminadas por fungos e em sidra doce de maçã comercial em níveis até 45 µg/litro. Foi também identificada em numerosas outras frutas bolorentas, vegetais, cereais e rações para animais; sendo estável em sumos de maçã e de uva e no milho seco. No entanto, em quase todos os casos, a contaminação com patulina foi limitada a alimentos em fase de apodrecimento ou bolorentos (*in* <http://www.micotoxinas.com.br/patufacts.htm>).

Pode, portanto, ocorrer em níveis elevados no sumo de maçã, incluindo sumo pasteurizado de maçã, caso tenham sido usadas maçãs bolorentas, podres ou danificadas para fazer esses sumos, e conseqüentemente entrar na cadeia alimentar humana.

2.4.2 Propriedades Químicas e Físicas

A patulina cuja designação química é 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-ona, tem a fórmula molecular, $C_7H_6O_4$ apresentando um peso molecular de 154 e o n.º CAS 149-29-1. Trata-se de uma toxina produzida durante o crescimento de certos fungos (especialmente do género *Penicillium*) em maçãs (*Pyrus malus*) já colhidas, com a estrutura química descrita na Figura 2.13.

A molécula desta toxina está relacionada com a família química das lactonas e derivadas do ácido 6-metilsalicílico sendo portanto uma lactona heterocíclica insaturada, solúvel em água, e menos volátil do que esta (Kryger, 2001). Inicialmente isolada como um antibiótico durante os anos 40 (Stott and Bullerman citado em Moake, 2005) trata-se de um composto incolor, cristalino com um ponto de fusão de 110 °C. O máximo da absorção UV acontece aos 276 nm ($\epsilon = 14,450$). O espectro de massa EI mostra iões proeminentes em m/z 154 (M^+), 136, 126, 110, 97, 82, 71, 69, 55 e 53.

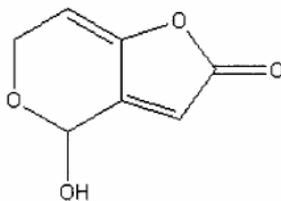


Figura 2.13 - A estrutura da patulina (Kryger, 2001)

Quando as maçãs contaminadas com esta micotoxina são processadas de forma a se obter o sumo, a patulina pode ser introduzida neste e conseqüentemente na cadeia alimentar humana, porque não é destruída pelo tratamento térmico. Apesar da patulina ser estável ao calor, a $pH < 6$, é no entanto destruída pelo processo de fermentação do sumo de maçã a sidra e na produção de vinho (Delage et al., 2003). Por outro lado, é gradualmente destruída durante o armazenamento na presença de sulfitos, grupos tiol e ácido ascórbico.

2.4.3 Aspectos toxicológicos

Os estudos de alimentação animal demonstraram que níveis elevados de patulina no sumo de maçã poderiam implicar um risco acrescido na saúde se fosse consumido durante um período de tempo prolongado. A maçã e produtos derivados contaminados com patulina provoca um sério risco à saúde dos consumidores, particularmente das crianças conforme demonstrado por um estudo da USDA os quais consomem quantidades crescentes de produtos contendo maçã durante o primeiro ano de vida (6.4 g/kg peso corporal/dia), comparado com os adultos (1 g/kg peso corporal/dia), colocando-os perante um risco elevado da toxicidade da patulina (Plunkett et al. citado em Moake, 2005).

Para além de ser considerada bactericida e fungicida, quando injectada em ratos, em concentrações 0.3-2.5 mg/g provoca-lhes morte imediata, por causar edema cerebral, hemorragias nos pulmões e danificações capilares no fígado e nos rins. A patulina não produz efeitos teratogénicos, embora se tenha observado toxicidade no embrião e em doses elevadas, tem efeito imunossupressor (FAO/WHO, 1995).

Inicialmente isolada como um antibiótico antifúngico de largo espectro, foi mais tarde demonstrado que inibia o desenvolvimento de mais de 75 espécies bacterianas diferentes incluindo tanto bactérias gram-positivas como gram-negativas. Os estudos continuados sobre a aplicação deste composto, sugerindo que a patulina tinha aplicações no tratamento da congestão nasal e das gripes, mostraram que tais propriedades não podiam ser suportadas pelos estudos clínicos. Não muito tempo depois, variados estudos apontaram que a patulina seria não apenas tóxica a fungos e bactérias mas também a animais e plantas superiores, incluindo pepino, trigo, ervilhas, milho e linho (Moake, 2005).

Um largo número de estudos durante os últimos 50 anos implica um vasto número de efeitos na saúde classificados em agudos, crónicos e celulares os quais são apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Os efeitos da patulina na saúde (Moake et al., 2005)

<i>Sintomas agudos</i>
Agitação, convulsões, dispneia, congestão pulmonar, edema, hiperemia, distensão do tracto gastro-intestinal, náuseas, degeneração epitelial das células, hemorragia intestinal, ulceração
<i>Sintomas crónicos</i>
Genotóxico, neurotóxico, imunotóxico, imunossupressivo, teratogénico, carcinogénico
<i>Efeitos ao nível celular</i>
Disrupção da membrana plasmática, inibição da síntese de proteínas, disrupção da transcrição, inibição da síntese do DNA, inibição da RNA polimerase, inibição da Na-K ATPase, inibição da urease, etc.

Nos anos mais recentes, o conteúdo em patulina de produtos de maçã teve um interesse particular porque a pesquisa mostrou que a patulina é um possível carcinógeno e mutagénico (Kryger, 2001). A acrescentar a isso, foi relatado que a patulina podia ser mutagénica, neurotóxica, genotóxica, imunotóxica e capaz de causar efeitos gastrointestinais em roedores mas pouco é conhecido acerca dos seus efeitos carcinogénicos no caso dos seres humanos (Pfohl-Leskowicz citado em Delage et al., 2003).

2.5 PRÁTICAS PARA PREVENIR E CONTROLAR A CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS

Para delinear estratégias para a redução ou eliminação de micotoxinas, é necessário conhecer as respectivas fontes fúngicas, i.e., os fungos que as produzem. O crescimento de fungos nas plantações e produtos agrícolas é a maior causa da formação de toxinas e está relacionado com as concentrações das substâncias tóxicas. Muitos factores estão envolvidos no aumento da proliferação de micotoxinas. Entre eles estão a susceptibilidade da planta à infestação fúngica, a adequação do substrato fúngico, climas temperados, conteúdo de humidade e danos físicos das sementes devido à acção dos insectos e pestes.

Os fungos produtores de toxinas podem invadir as culturas em qualquer altura, desde que as condições sejam propícias, pelo que a contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, i.e., antes, durante e ou após a colheita, aquando da manipulação pós-colheita, no transporte e no armazenamento dos produtos.

De acordo com o local onde o fungo infesta os grãos, os fungos toxigênicos podem ser divididos em três grupos: (a) fungos do campo; (b) fungos do armazenamento e (c) fungos de deterioração avançada.

A primeira categoria inclui espécies de fungos patogênicos às plantas, nomeadamente dos géneros *Fusarium*, e.g. *F. moniliforme*, *F. roseus*, *F. tricinctum* e *F. nivale*. Os " fungos do armazenamento" são principalmente dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, e.g. *A. flavus* e *A. parasiticus*. Os fungos "oportunistas" ou de deterioração avançada normalmente não infestam os grãos e plantas intactos mas facilmente atacam os que estejam danificados e necessitam de altos teores de humidade. Alguns exemplos deste terceiro tipo são *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *Chaetomium*, *Scopulariopsis*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Absidia*.

Em geral, a prevenção da contaminação por fungos e suas micotoxinas em produtos da agricultura pode ser dividida nos três níveis a seguir indicados:

1. Prevenção Primária

A etapa de prevenção deve inicialmente ser realizada antes da infestação fúngica e da contaminação por micotoxinas. Este nível de prevenção é o mais importante e efectivo plano para reduzir o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas. Várias práticas foram e têm sido recomendadas para manter as condições menos favoráveis ao crescimento fúngico. Estas incluem:

- O desenvolvimento de variedades de plantas resistentes aos fungos;
- O controlo da infecção fúngica das culturas e plantações ainda no campo, usando fungicidas que impedem o crescimento de fungos;
- A programação mais adequada para a pré-colheita, colheita e pós-colheita;
- A diminuição do conteúdo de humidade das sementes das plantas, depois da pós-colheita e durante o armazenamento;
- O armazenamento dos produtos a baixas temperaturas sempre que possível e controlando a infestação por insectos dos grãos armazenados com insecticidas aprovados

2. Prevenção Secundária

Se a invasão de alguns fungos já tiver começado numa fase avançada, será então necessário este nível de prevenção. Os fungos toxigénicos existentes deverão ser eliminados ou o seu crescimento deve ser interrompido de modo a prevenir adicionais deteriorações e consequente contaminação por micotoxinas.

Várias medidas são sugeridas neste caso:

- Paragem do crescimento dos fungos infestantes pela re-secagem dos produtos;
- Remoção das sementes contaminadas;
- Inactivação ou destoxificação das micotoxinas contaminadas;
- Protecção dos produtos armazenados de quaisquer condições que possam favorecer o desenvolvimento fúngico.

3. Prevenção Terciária

A partir do momento em que o produto esteja grandemente infestado de fungos tóxicos, as prevenções primária e secundária deixarão de ser eficazes. Nenhuma das acções ou práticas previstas será tão efectiva para parar o desenvolvimento dos fungos tóxicos e reduzir a formação da toxina.

No entanto, algumas medidas devem ser tomadas para prevenir a transferência de fungos e das toxinas prejudiciais à saúde que estejam presentes nos produtos contaminados para os alimentos e ambiente circundante.

Por exemplo, óleo de amendoim extraído das sementes de menor qualidade contém sempre altos níveis de aflatoxinas e a toxina solúvel no óleo tem que ser eliminada por absorção e alcalinização durante o processo de refinação do óleo. Para este nível de prevenção apenas umas poucas práticas são recomendadas:

- A completa destruição dos produtos contaminados;
- A destoxificação ou destruição de micotoxinas a níveis mínimos.

Existe também um conjunto de práticas aplicáveis à produção e ao manuseamento que poderão contribuir para diminuir a extensão da contaminação por micotoxinas, das culturas e produtos agrícolas, tanto no campo como no armazém.

Antes da colheita:

1. Fazer a chamada rotação das culturas
2. Combater e prevenir as doenças e as pragas
3. Evitar danos mecânicos

Durante a colheita:

1. Extrair apenas no ponto óptimo de maturação
2. Distribuir convenientemente o grão
3. Bater e ensacar somente quando o grão estiver completamente seco

No transporte:

1. Proteger contra a chuva

No armazenamento:

1. Manter o armazém sempre limpo;
2. Armazenar o amendoim ainda em casca;
3. Não fazer pilhas/montões muito grandes;
4. Fazer a pré-limpeza dos grãos;
5. Monitorizar a humidade relativa do ar;
6. Não deixar o produto em contacto directo com o chão ou encostado às paredes;
7. Se o grão estiver bem seco (<9%), proteger devidamente com lona plástica em época de muita chuva, para evitar o seu re-humedecimento;
8. Combater os insectos e roedores;
9. Inspeccionar, com regularidade, o armazém para certificar-se da manutenção as boas condições de higiene, temperatura e humidade.

Esta informação foi recolhida e adaptada em <http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036e0q.htm> e <http://www.micotoxinas.com.br/Boletim7.htm>

2.6 PRECAUÇÕES A TER NA MANIPULAÇÃO DE MICOTOXINAS

Apresentando as micotoxinas efeitos tão nefastos ao Homem e o mesmo se passando com alguns solventes utilizados na sua extracção e purificação, como por exemplo, o clorofórmio, o acetonitrilo, etc., é fundamental ter o maior cuidado na manipulação destes e de padrões ou de quaisquer outras soluções que possam conter micotoxinas, de modo a evitar a contaminação do local de trabalho e do próprio analista. Todas estas manipulações devem ser efectuadas em *hottes* e quando se trabalha com micotoxinas em pó, é necessário um cuidado e atenção redobrados, pois devido à natureza electrostática, aquelas têm tendência a dispersarem-se.

Local e material de trabalho

O local e o material de trabalho contaminados (ou considerados contaminados) com micotoxinas devem ser descontaminados, procedendo-se do seguinte modo: as áreas de trabalho acidentalmente contaminadas devem ser limpas com uma solução de hipoclorito de sódio a 1 %, seguida de limpeza com uma solução de acetona a 5%; no caso de derrame acidental de soluções contaminadas, a área afectada deve ser completamente coberta com uma solução de hipoclorito de sódio (lixívia) durante, aproximadamente, 30 minutos.

Pessoal

Os analistas que trabalham com micotoxinas deverão fazê-lo sempre na *hotte*. Para além disso, deverão usar luvas protectoras e máscaras, quando estiverem a manipular padrões no estado seco ou outros produtos tóxicos finamente divididos (em pó). Se as mãos ou a roupa forem contaminadas, estas devem ser passadas por uma solução de hipoclorito de sódio a 1%. As batas e panos utilizados, antes de serem lavados, devem ser mergulhados numa solução de hipoclorito de sódio, durante duas horas, e em seguida numa solução de acetona a 5%.

Material de vidro

O material de vidro utilizado nas determinações analíticas e que tenha entrado em contacto com soluções potencialmente contaminadas com micotoxinas, deve ser passado por metanol e posteriormente imerso numa solução de hipoclorito de sódio a 1%, pelo menos

durante 2 horas, e depois numa solução de acetona a 5%. Em seguida proceder-se-á à sua lavagem. As placas de cromatografia, antes de serem lavadas ou eliminadas, devem ser pulverizadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% e decorridos 10 minutos, com uma solução de acetona a 5%. As soluções de solventes orgânicos, com micotoxinas, só devem ser eliminadas depois de se proceder, à evaporação até à secura, junção de metanol ao resíduo, seguido de adição de hipoclorito de sódio a 1%, com agitação durante duas horas ou sujeitos a repouso durante toda uma noite e por fim, passagem com solução de acetona a 5%. Há que ter em conta que todo o material assim descontaminado, bem como o material que vai ser utilizado, pela primeira vez, na determinação de micotoxinas, deve ser imerso numa solução de ácido sulfúrico (2 mol/L) durante várias horas e depois lavado com água. Isto porque a utilização de material com características alcalinas pode levar a perdas nas micotoxinas (in http://www.fda.gov/ora/science_ref/lm/vol4/section/07.pdf e <http://mohfw.nic.in/Methodsof%20Analysis-%20Mycotoxins%20-Final%20-nov05.pdf>).

O equipamento, a roupa e outros objectos

As micotoxinas são estáveis no e à temperatura ambiente, resistentes ao calor e à luz ultravioleta. A descontaminação do ambiente/local requer o uso de uma solução branqueadora com cloro sob condições alcalinas tais como uma solução de hipoclorito de sódio - 1% (1 parte lixívia + 4 partes água) e hidróxido de sódio - 0.1M durante (pelo menos) uma hora. É necessário usar equipamento de protecção da pele e olhos como máscaras, uma vez que as toxinas podem ser absorvidas pelas vias respiratória, gastrointestinal, dérmica e ocular e as soluções de cloro são irritantes.

2.7 A situação em Portugal e na UE

Em Portugal, nos últimos 10 anos, a aflatoxina B1 teve uma ocorrência próxima dos 10%, com 2 picos em 1998 (32%) e 2003 (17,6%). Estes picos relacionam-se com crises de abastecimento, em que se recorre a fornecedores (países terceiros) com menor qualidade. Os casos mais complicados ocorreram nos bovinos em que o nível de prevalência de contaminação andou sempre próximo dos 30% a 40% e nos leites, em que 15,4% tinham um nível de contaminação acima do LMA.

Ao longo dos anos, a UE tem porfiado para que os consumidores europeus tenham acesso a alimentos seguros e inócuos. Parte importante desta tarefa tem sido desenvolvida no RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) que é um dos instrumentos da UE cuja missão é reduzir o tempo que medeia entre a deteção de um risco alimentar e a aplicação de medidas convenientes à contenção e eliminação desse risco. Para se ter uma ideia, e de acordo com informação da Comissão Europeia, durante o ano de 2005, os Estados-Membro comunicaram um total de 3158 casos de alertas alimentares, tendo-se pois verificado um aumento de 22% quando comparado com 2004 em que o número de notificações tinha sido de 2588.

Ainda quanto ao dados de 2005, a maioria destes alertas (61%) diziam respeito a produtos produzidos na UE, destacando-se o pescado e derivados (20%), a carne (18%) e especiarias (11%). Para além disso, registe-se que 78% dos casos notificados eram devidos a alimentos produzidos/provenientes de países terceiros.

Do total das notificações apresentadas ao RASFF, as aflatoxinas são as que encabeçam a lista de notificações, com 947. Na maioria destes casos, as aflatoxinas foram encontradas em pistachos (498), quase todos provenientes do Irão (457). Foram também notificados casos em amendoins (219), provenientes na sua maioria da China (79), Brasil, Argentina e Gana.

Portugal sendo um Estado Membro da União Europeia tem contribuído de alguma forma nos diversos eventos relacionados com a recolha de informação sobre a ocorrência e exposição dos seus cidadãos a algumas micotoxinas veiculadas pela dieta alimentar.

Apresenta-se a seguir uma breve discussão sobre três micotoxinas (micotoxinas de *Fusarium*, ocratoxina A e patulina) cuja ingestão foi avaliada e cujos dados entretanto recolhidos foram compilados em relatórios sob a chancela da Direcção-Geral da Saúde e Protecção dos Consumidores (da União Europeia).

2.7.1 Compilação de dados de ocorrência das toxinas de *Fusarium* em alimentos e avaliação da ingestão pela dieta pela população dos Estados Membro da UE (Abr 2003)

2.7.1.1 Dados de Ocorrência

Foi solicitado a treze (13) países que fornecessem informações acerca da exposição da respectiva população às toxinas *Fusarium*.

A **Tabela 2.6** mostra os países participantes e as respectivas contribuições. Doze (12) países forneceram dados sobre os tricotecenos e nove (9) países sobre a zearalenona e sobre as fumonisinas. Como se pode observar, Portugal contribuiu com dados relativos aos tricotecenos e zearalenona, mas não deu a conhecer eventuais aferições no que diz respeito às fumonisinas.

Tabela 2.6 – Países participantes e suas contribuições

Países participantes	Subtarefa I Tricotecenos	Subtarefa II Zearalenona	Subtarefa III Fumonisinas
Áustria	X	X	X
Bélgica	X	-	X
Dinamarca	X	-	-
Finlândia	X	X	-
França	X	X	X
Alemanha	X	X	X
Irlanda	-	-	-
Itália	X	X	X
Holanda	X	X	X
Noruega	X	X	X
Portugal	X	X	-
Suécia	X	-	X
Reino Unido	X	X	X
Soma:	12	9	9

A **Tabela 2.7** apresenta a informação estruturada por país, por micotoxinas, por número de amostras analisadas e por percentagem de amostras positivas. A base de dados cobre no total 16 micotoxinas de *Fusarium* e 44 959 análises.

Tabela 2.7 - Os dados de ocorrência das micotoxinas de *Fusarium* nos países participantes

Toxina de <i>Fusarium</i>	Países	Número de amostras	Amostras positivas (%)
Fumonisinias			
Fumonisinina B1	9	3 863	46
Fumonisinina B2	6	1 010	42
Fumonisinina B3	1	239	36
Tricotecenos Tipo A			
Toxina T-2	8	2 490	20
Toxina HT-2	6	3 032	14
T-2 Triol	2	1 389	6
Neosolaniol	2	1 323	1
Diacetoxiscirpenol	3	1 886	4
Monoacetoxiscirpenol	1	853	1
Verrucarol	1	121	0
Tricotecenos Tipo B			
Desoxinivalenol	11	11 022	57
Nivalenol	7	4 166	16
3-Acetil-desoxinivalenol	6	3 721	8
15-Acetil-desoxinivalenol	3	1 954	20
Fusarenona X	3	1 872	10
Zearalenona			
	9	5 018	32
Soma:	--	44 959	--
Ordem de valores:	1-11	121-11 022	0-57

As amostras positivas vão desde 0% para o verrucarol até 57% para o desoxinivalenol, observando-se, no entanto, que o grupo das fumonisinias apresentam todas um valor superior ou igual a 36%.

Porém, é importante notar que pela análise dos números apresentados nesta tabela, o que se consegue constatar é que as toxinas cujos dados de ocorrência foram relatados por um maior número de países – entre 8 e 11 países – e num maior número de amostras – superior ou igual a 2490 amostras – são as que apresentam maior percentagem de amostras positivas (com excepção da Fumonisinina B3 e do 15-desoxinivalenol que foram apresentados por 1 e 3 países, e com 239 e 1872 amostras apenas, respectivamente).

A **Tabela 2.8** sumariza a categoria de alimentos mais frequentemente contaminada com micotoxinas de *Fusarium*. Os cereais aparecem em primeiro lugar e de entre eles, o milho e o trigo apresentam os mais altos níveis de contaminação.

Tabela 2.8 - Sumário do grupo de alimentos mais frequentemente contaminados com micotoxinas de *Fusarium*

Micotoxinas de <i>Fusarium</i>	Principais produtos alimentares/grupos de alimentos contaminados (percentagem de amostras positivas)
Fumonisinias	
Fumonisinina B1	milho (66%), farinha de milho (79%), produtos baseados em milho (31%), <i>corn flakes</i> (46%); trigo (79%)
Fumonisinina B2	milho (51%)
Tricotecenos Tipo A	
Toxina T-2	milho (28%), trigo (21%), aveia (21%)
Toxina HT-2	aveia (41%), milho (24%), centeio** (17%)
Zearalenona	milho (79%), fracções de milho moído (51%), produtos baseados em milho (53%); trigo (30%), fracções de trigo moído (24%), produtos baseados em trigo (11%); alimentos para bebé (23%)
Tricotecenos Tipo B	
Desoxinivalenol	milho (89%), trigo* (61%)
Nivalenol	milho (35%), aveia (21%), trigo*(14%)
3-Acetil-desoxinivalenol	milho (27%), trigo*(8%)

* Trigo e farinha de trigo; ** Centeio e farinha de centeio

2.7.1.2 Sumário dos dados sobre o consumo

Os dados sobre o consumo para as três tarefas sobre os tricotecenos, zearalenona e fumonisinias foram fornecidos por 11, 9 e 7 países, respectivamente e estão indicados na **Tabela 2.9**.

Várias metodologias foram usadas nos e pelos Estados Membros para calcular o consumo de alimentos pela população em geral e ou por grupos específicos de consumidores.

Tabela 2.9 - Sumário dos dados sobre o consumo de alimentos nos vários países

Países participantes	Subtarefa I Tricotecenos	Subtarefa II Zearalenona	Subtarefa III Fumonisinias
Áustria	X	X	X
Bélgica	X	-	X
Dinamarca	X	-	-
Finlândia	X	X	-
França	X	X	X
Alemanha	X	X	X
Itália	X	X	X
Holanda	X	X	X
Noruega	X	X	X
Portugal	-	X	-
Suécia	X	-	-
Reino Unido	X	X	-
Soma:	11	9	7

No que diz respeito aos dados de consumo de alimentos para as tarefas sobre os tricotecenos, as fumonisinas e a zearalenona, Portugal apenas surge na subtarefa sobre esta última, indiciando a inexistência de dados sobre as restantes.

2.7.1.3 Sumário da ingestão pela dieta

A ingestão pela dieta foi calculada para 12 (tricotecenos), 9 (zearalenona) e 7 países (fumonisinas) Tabela 2.10, uma vez que não foram apresentados dados sobre todas as micotoxinas. Neste caso, Portugal participou em 2 subtarefas, contribuindo com dados sobre a zearalenona e tricotecenos.

Tabela 2.10 - Países participantes e suas contribuições

Países participantes	Subtarefa I Tricotecenos	Subtarefa II Zearalenona	Subtarefa III Fumonisinias
Áustria	X	X	X
Bélgica	X	-	X
Dinamarca	X	-	-
Finlândia	X	X	-
França	X	X	X
Alemanha	X	X	X
Itália	X	X	X
Holanda	X	X	X
Noruega	X	X	X
Portugal	X	X	-
Suécia	X	-	-
Reino Unido	X	X	-
Soma:	12	9	7

Uma vista geral dos cálculos das médias de ingestão pela dieta e dos valores de TDI é dada na Tabela 2.11. Os valores médios calculados da ingestão pela dieta para a maioria das toxinas de *Fusarium* foram tidos como sendo consideravelmente abaixo dos valores de TDI(t).

As maiores ingestões e uma transgressão dos valores de TDI(t) foram observadas para o grupo infantil e de crianças. As ingestões maiores do que o TDI foram notadas na soma da toxina T-2 e toxina HT.

Tabela 2.11 - Escalas das médias de ingestão pela dieta entradas* calculadas como a percentagem dos valores de TDI

Micotoxina	TDI (µg/kg pc/dia)	População (%)	Adultos (%)	Crianças (%)
Desoxinivalenol	1	0.8 - 33.8	14.4 - 46.1	11.3 - 95.9
Nivalenol**	0.7	4.2 - 11.1	0.8 - 8.2	3.7 - 22.6
Toxinas T-2 + HT-2 **	0.06	18.3 - 250	61.7 - 171.7	26.7 - 563.3
Zearalenona**	0.2	13.4	5.3 - 14.5	3 - 27.5
Fumonisinas B1 + B2	2	0.8 - 13.2	0.1 - 14.1	22.3

* média do consumo do alimento (*Mean food consumption*) e média dos dados de ocorrência (*mean occurrence data*)

** TDI Temporário

Para o **desoxinivalenol** o nível médio de ingestão para a população assim como para o grupo limitado aos adultos é baixo e não excede 46.1% do TDI de 1 µg/kg peso corporal/dia. No entanto, para o grupo das crianças e dos adolescentes a ingestão pode aproximar-se do TDI e nalguns casos exceder esse valor.

No que diz respeito ao **nivalenol**, o total da ingestão é muito inferior ao TDI(t) de 0,7 µg/kg peso corporal/dia.

Relativamente às **toxinas T-2 e HT-2** o TDI(t) de 0.06 µg/kg peso corporal/dia para a soma das duas toxinas é frequentemente ultrapassado. No entanto, a importância do número total de amostras positivas deve ser considerada. Apenas 20% das amostras testadas para a toxina HT-2 e 14% das amostras testadas para a toxina T-2 foram positivas. Consequentemente a média (e a ingestão) é fortemente influenciada pelo limite de detecção dos métodos analíticos usados.

O trigo e os produtos que contêm trigo (p.e., o pão) são a fonte predominante para a ingestão do DON, da toxina T-2, do NIV e da toxina HT-2. Quanto aos outros tricotecenos, e de acordo com a informação disponível, a ingestão é muito pequena.

A **zearalenona** apresenta uma média de ingestão diária nos adultos que vai desde 0.8 a 29 ng/kg peso corporal. As crianças têm os mais altos valores médios de ingestão diária, variando entre 6 a 55 ng/kg peso corporal/dia. No entanto, o t-TDI de 0.2 µg/kg peso corporal/dia não é excedido. As maiores fontes para a ingestão desta toxina foram o milho, o trigo e produtos derivados.

A média de ingestão diária das **fumonisin**as é muito inferior ao TDI de grupo que é de 2 µg/kg peso corporal/dia. Os maiores valores acontecem nas crianças. Os cereais representam a maior fonte de ingestão de fumonisin

as. Entre os cereais, o milho e o trigo dominam como os maiores contribuintes para o total da ingestão.

2.7.1.4 Conclusões

Os resultados desta tarefa demonstram que as micotoxinas de *Fusarium* estão largamente distribuídas na cadeia alimentar na UE. As maiores fontes são os produtos obtidos de cereais, em particular, do trigo e do milho. Enquanto que as ingestões pela dieta de toxinas de *Fusarium* são frequentemente menores que o TDI para as diversas toxinas para a população inteira e ou adultos, elas são próximas ou excedem mesmo, em alguns casos, o TDI para grupos de risco como os bebés e crianças.

As variações no clima, nos produtos e no consumo resultam em padrões diferentes sobre o tempo e a região. Consequentemente, é recomendada a monitorização contínua do *status* da toxina. Até aqui, a avaliação científica das ameaças causadas por toxinas de *Fusarium* é impedida pelos diferentes padrões e metodologias aplicadas nos Estados Membros. A falta de harmonização nos procedimentos de amostragem, métodos analíticos, garantia de qualidade dos dados, o tipo de produtos analisados e o largo espectro de metodologias diferentes para calcular os dados do consumo poderiam em alguns casos influenciar a fiabilidade dos resultados.

O relatório propõe que a UE inicie projectos sobre este propósito. Em particular, são necessárias directrizes específicas com vista a melhorar a harmonização da metodologia para a pesquisa de dados de consumo. A fim de avaliar mais exactamente a exposição da população europeia, os dados da exposição devem ser relacionados somente aos consumidores e precisamente definidos, por exemplo, pela idade.

Não obstante, a informação fornecida pelos Estados Membros é suficiente para avaliar o estado da contaminação das toxinas de *Fusarium* e a ingestão pela dieta como um requisito para legislação europeia futura.

2.7.2 Compilação de dados de ocorrência da *ocratoxina A* em alimentos e avaliação da ingestão pela dieta pela população dos Estados Membro da UE

Em 1995, a Tarefa 3.2.2 relativa à avaliação da ingestão pela dieta de ocratoxina A pela população ficou completa e resultou no relatório EUR 17523 "*Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States*". O relatório foi extremamente útil como uma ferramenta para informação básica e para decisão futura, mas admitiu-se que as estimativas de ingestão pela dieta da ocratoxina A foram baseadas numa quantidade limitada de dados.

O Comité Comum de peritos da FAO/WHO em aditivos alimentares (JEFCA), com base na nefrotoxicidade da OTA, propôs uma ingestão semanal tolerável transitória (PTWI) de OTA de 0.1 mg/kg massa corporal (equivalente a 14 ng/kg massa corporal/dia). No entanto, com base nos dados de carcinogenicidade, o grupo de trabalho do conselho de ministros nórdico propôs uma ingestão diária tolerável máxima de 5 ng/kg pc da toxina, à semelhança da ingestão diária tolerável transitória (PTDI) estabelecida pelas autoridades Canadianas (1.2 - 5.7 ng/kg pc).

Em 1998, tendo em conta os dados da *SCOOP* o Comité Científico para os alimentos da Comissão Europeia sugeriu que seria prudente reduzir a exposição à OTA tanto quanto possível, “assegurando-se de que o nível das exposições estejam muito próximas da extremidade mais baixa da escala das ingestões diárias toleráveis de 1.2 - 14 ng/kg pc/dia que foram estimadas por outros corpos, p.e., abaixo de 5 ng/kg pc/dia”. Foi então efectuada uma actualização da tarefa empreendida em 1995 e completando-a com dados recentes, a fim de verificar se estes dados (recentes) alteravam ou não as conclusões do relatório EUR 17523.

A informação dos países participantes foi recolhida entre Novembro de 1999 e Setembro de 2000. Todos os treze (13) países participantes enviaram resultados sobre a ocorrência de OTA em alimentos. Seis (6) participantes enviaram resultados sobre soro/sangue e quatro (4) sobre leite de peito. Foram também fornecidos por três (3) países, resultados em outros líquidos humanos (urina e líquido amniótico) e em tecidos (placenta).

Os países participantes providenciaram um número considerável de dados sobre a ocorrência da OTA, relacionado com os produtos alimentares encarados como sendo os mais susceptíveis à contaminação pela OTA e sobre o seu consumo.

Um número notavelmente elevado de dados em fluidos biológicos demonstrou também o interesse nesta área. O volume de informação permite tirar conclusões relevantes de diferentes pontos de vista e fornecer recomendações para trabalho futuro.

2.7.2.1 Dados sobre o consumo

A escassez de dados de consumo persiste ainda em alguns países. Em particular, a informação sobre alguns produtos alimentares tais como cereais, vinho, café, e cerveja, geralmente não está disponível nos principais países participantes. Além do mais, não foi possível manipular os dados fornecidos homogeneamente, uma vez que foram referidos, em alguns casos, a toda população e noutros casos a grupos específicos da população.

Os cereais representam a principal fonte de ingestão na Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Noruega, Portugal, Espanha, Suécia para todos os grupos da população tidos em consideração, e representam a principal fonte de ingestão apenas para o total da população na Holanda e Reino Unido.

A Grécia não forneceu quaisquer dados de ocorrência em cereais. Entre os grãos de cereal, o centeio parece ser o mais frequente e extensamente contaminado.

Na **Tabela 2.12** é apresentada de uma forma succinta a Regulamentação actual para a Ocratoxina A em cada Estado Membro.

Tabela 2.12 Regulamentação actual para a ocratoxina A em cada Estado Membro

País	Produto Alimentar	Limite Máximo (µg/kg)	Base Legal	Obs.:
Dinamarca	Rins de porco	25	Oficial	A carcaça inteira condenada Viscera condenada A partir de 1 Julho 1995
	Rins de porco	10	Oficial	
	Cereais e produtos cereais	5	Oficial	
Finlândia	Café	5	Nível recomendado	
França	Cereais	4	Nível recomendado	Recomendação do CSHPF (1999)
Alemanha	Não há regulação específica			
Grécia	Café (todos os tipos)	20	Oficial	Decisão do Ministro da Agricultura n.º 91587/1992
Irlanda				
Itália	Cereais e produtos derivados	3	Nível recomendado	A partir de 9 Junho 1999
	Alimentos para bebés	0.5		
	Café verde	8		
	Café instantâneo e torrado	4		
	Produtos derivados do cacau	0.5		
	Cerveja	0.2		
	Carne de porco e produtos derivados	1		
Noruega				
Portugal				
Espanha	Não há regulação específica			
Suécia	Cereais e produtos cereais	5	Oficial	
Holanda	Todos os alimentos	10	Nível de acção	Organização: FIS
Reino Unido	Não há regulação específica			
UE	Cereais não processados	5	Oficial	Aplicável a partir de 1 Outubro 2001
	Cereais destinados ao consumo humano	3		
	Uvas secadas	10		

A seguir apresentam-se alguns dados relativos a Portugal que não tinha participado na 1ª fase do processo (Tarefa 3.2.2), mas que já apresentou resultados na fase da actualização do relatório (Tarefa 3.2.7).

Na Tabela 2.13 apresentam-se os dados fornecidos por Portugal para cada produto alimentar para a Tarefa 3.2.2 e a Tarefa 3.2.7. A seguir, na Tabela 2.14, apresenta-se um resumo dos dados de consumo em Portugal e por fim, na Tabela 2.15, a estimativa da ingestão pela dieta de ocratoxina A em Portugal.

Tabela 2.13 Dados fornecidos por Portugal para cada produto alimentar para a Tarefa 3.2.2 e a Tarefa 3.2.7

Produto alimentar	Tarefa 3.2.2			Tarefa 3.2.7		
	N.º de amostras	N.º de amostras positivas	% de amostras positivas	N.º de amostras	N.º de amostras positivas	% de amostras positivas
Cerveja				7	3	42.9
Café instantâneo				2	0	0.0
Noz moscada				3	3	100
Café torrado				33	6	18.2
Sucedâneo de café				3	0	0.0
Pimenta doce				6	3	50.0
Trigo				34	0	0.0
Farinha de trigo branca				8	0	0.0
Vinho				61	0	0.0

Tabela 2.14 Sumário dos dados de consumo em Portugal

Produto alimentar	Valor médio (g/pessoa/dia)
Cerveja	177,3
Vinho rosé (vinho verde)	149,3
Vinho doce*	1,1
Café (todos os tipos)	10,1
Trigo e farinha de trigo branca	235,1

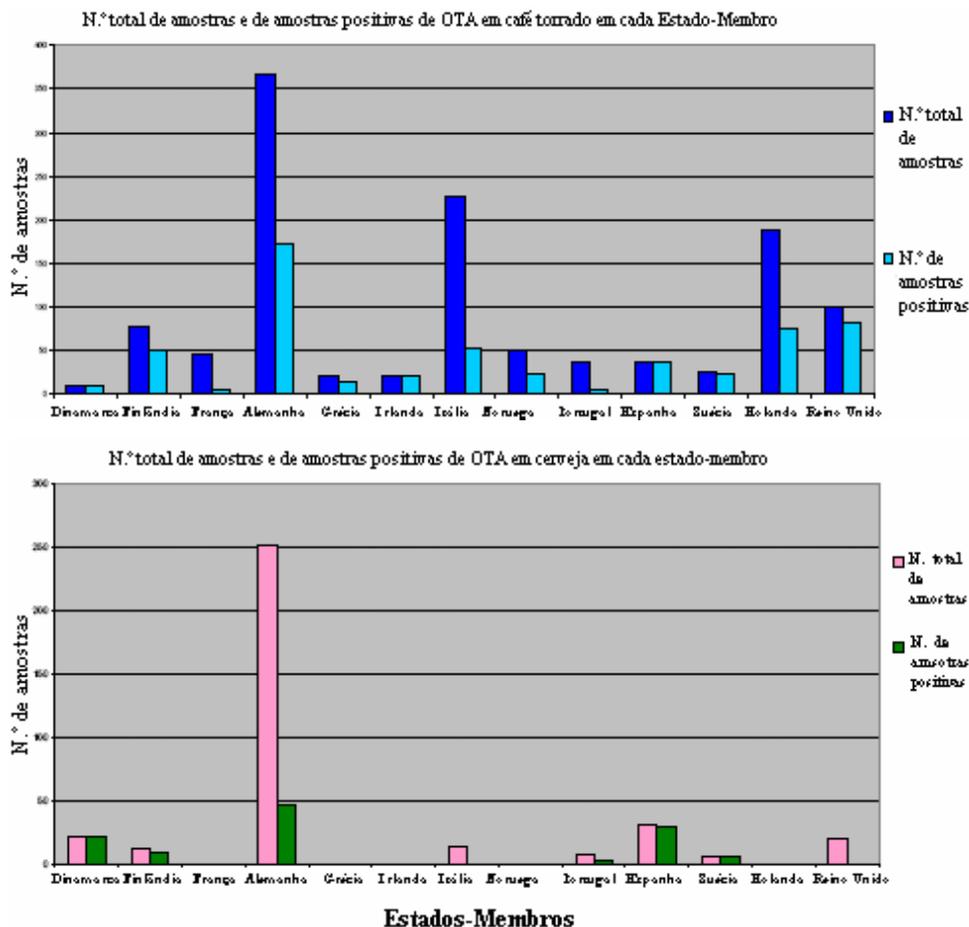
* tipo de vinho não especificado

Tabela 2.15 Estimativa da ingestão pela dieta de ocratoxina A em Portugal

Produto alimentar	Consumo de alimentos (g/pessoa/dia)		Média de ocratoxina A nos alimentos (µg/kg)			Ingestão de ocratoxina A (ng/pessoa/dia)				Ingestão de ocratoxina A (ng/kg peso corporal/dia)			
	Média	Percentil 95	M1	M2	Intervalo	M1	M2	Percentil 95		M1	M2	Percentil 95	
								M1	M2			M1	M2
Cerveja	177,3		0,00	0,00	< LOD – 0,006	0,35	0,71			0,01	0,01		
Vinho rosé	149,3		0,01	--	< LOD	1,49	--			0,02	--		
Vinho doce	1,1		0,01	--	< LOD	0,01	--			0,00	--		
Café (todos os tipos)	10,1		0,60	1,87	< LOD – 2,7	6,06	18,89			0,09	0,29		
Trigo/farinha branca de trigo	235,1		0,19	--	< LOD	44,67	--			0,69	--		

Legenda: M1, M2 – média 1 e 2, respectivamente

A seguir apresentam-se alguns gráficos de barras com dados relativos a cada um dos Estados-Membro relativamente ao número total de amostras e número de amostras positivas em OTA em alguns produtos alimentares.



No caso de Portugal, a quantidade total de ingestão de OTA pela dieta e pelas maiores fontes alimentares são 0,81 ng/kg peso corporal/dia, para a população em geral; trigo e farinha de trigo branca: 0,69 ng/kg peso corporal/dia, respectivamente.

2.7.3 Compilação de dados de ocorrência da *patulina* em alimentos e avaliação da ingestão pela dieta pela população dos Estados Membro da UE

Ainda que a patulina não tenha apresentado nenhuma indicação/evidência de potencial mutagénico em bactérias *Salmonella typhinurium* no teste de Ames, sabe-se que produz danos cromossomais. O Comité do Reino Unido sobre mutagenicidade classificou a patulina como mutagénica. Uma recente revisão da JECFA concluiu que não tem nenhum efeito reprodutivo ou teratogénico. Baseado em resultados experimentais disponíveis, chegou-se à conclusão que a patulina é genotóxica, mas que não existia nenhuma evidência adequada para a carcinogenicidade em animais experimentais.

2.7.3.1 *Recomendações para uma exposição máxima*

Esta opinião foi baseada numa avaliação da JECFA de 1990 em que foi estabelecida a ingestão semanal tolerável provisional (PTWI) de 7 µg/kg, baseado num nível em que não foi observado nenhum efeito (NOEL) de 0,1 mg/kg pc/dia.

Tal resultou de um estudo combinado de toxicidade reprodutiva/toxicidade de longo termo/carcinogenicidade em ratos, e a conclusão da IARC de que nenhuma avaliação poderia ser feita da carcinogenicidade da patulina em pessoas e de que existe evidência inadequada em animais experimentais. A patulina foi reavaliada pela JECFA em 1995 e pareceu que, embora mais e diversos estudos fossem incorporados, o estudo acima mencionado ainda era o mais sensível. Uma vez que se tornou evidente que a patulina era administrada somente três vezes por semana durante 24 meses, o NOEL neste estudo foi recalculado para 43 µg/kg pc/dia. Como a patulina não se acumula no organismo e à luz do padrão de consumo, o PTWI foi alterado para um PMTDI. Baseado num NOEL de 43 µg/kg pc/dia e num factor de segurança de 100, foi então estabelecido um PMTDI de 0,4 µg/kg pc.

A informação dos países participantes foi recolhida durante o período de Junho 2001 a Janeiro 2002. De modo a obter o cenário global da exposição europeia à patulina, pela combinação dos dados de ocorrência da patulina em produtos alimentares e dados de consumo, foram seguidas várias aproximações, nomeadamente, por país, por produto alimentar e por grupos de população. Dos treze países participantes, dez enviaram resultados da ocorrência da patulina nos alimentos, com excepção da Dinamarca e Holanda por falta de resultados actuais.

Os comentários dos países participantes sobre os níveis de patulina, dados do consumo ou ingestão pela dieta, neste caso de Portugal resultou que não existem dados do consumo de sumos de maçã e de pêra. Existem apenas dados a respeito do total dos sumos consumidos, e estimaram que uma média de aproximadamente 5% estão relacionados com cada tipo de consumo dos sumos de maçã e de pêra.

2.7.3.2 Dados sobre a ocorrência

O estado dos níveis de contaminação de patulina dos géneros alimentícios:

- As percentagens de amostras positivas superiores a 25, respectivamente 50µg/kg eram 17,5 respectivamente 2.4% (cálculo com o número de amostras positivas do concentrado da maçã).
- Considerando o nível hipotético de 50 µg/kg da JECFA, os dados fornecidos da ocorrência para o sumo de maçã e seus produtos mostraram níveis muito poucos elevados de contaminação, conduzindo à conclusão geral que os produtos que circulam na UE são de boa qualidade sanitária no que diz respeito à contaminação com patulina.
- Uva fresca austríaca não deve ser fermentada nem aquecida, porque a contaminação com patulina pode ser maior do que no sumo de uva comercial.

O sumo/néctar de maçã (8 países) representa a principal fonte de ingestão na Áustria, Bélgica, França, Alemanha, Portugal e Reino Unido para todos os grupos da população considerada, particularmente para crianças jovens. O sumo de pêra (2 países) contribui para a ingestão total numa baixa extensão em Alemanha e Portugal.

Na Tabela 2.16 apresentam-se o número total de amostras de cada Estado Membro. A seguir, a Tabela 2.17, apresenta as melhores estimativas do consumo de alimentos em Portugal e por fim, na Tabela 2.18, o ranking das ingestões pela dieta, de patulina pelos adultos dos vários países.

Tabela 2.16 - Número total de amostras de cada país

País	Áustria	Bélgica	França	Alemanha	Itália	Noruega	Portugal	Espanha	Suécia	Reino Unido	Total
N.º de amostras	841	167	426	1978 (8286)**	190 (+85)*	281	43	70	100	3181	7277

* - amostras de maçãs, peras e pêssego não foram tidas em conta para o n.º total de amostras

** - não avaliadas porque o critério de cálculo (média 1, 2 e mediana) não estavam compilados

Tabela 2.17 - O essencial das melhores estimativas do consumo de alimentos em Portugal

Género alimentício ou grupo de alimentos	Média (g/dia)
sumo de maçã <i>clarificado</i>	0,86
sumo de maçã <i>Cloudy</i>	0,86
maçã e outros sumos de fruta	0,86
leite e sumo de maçã	0,86
sumo de pera <i>Cloudy</i>	0,86
pêras e sumos de outros frutos	0,86
leite e sumo de pêra	0,86
puré de maçã e de pêra	***

* Não existe consumo directo de purés de maçã e pêras, pois são só usados pela indústria.

Tabela 2.18 – Ranking das ingestões pela dieta de patulina pelos adultos (ng/kg peso corporal/dia)

País	Média 1	Maior quantidade	Grupo de população
Itália	9,6*	68*	P
Áustria	2,8	18	Adultos 36-45 anos, P
Alemanha	2,0	6,0	Adultos >14 anos, P
Bélgica	1,3	8,6	14-18 anos, P
França	1,2**	6,4	Adultos, P
Suécia	1,2	1,2	Adultos 19-74 anos, P
Noruega	1,1		P
Portugal	0,3		P
Espanha	0,2		P
ingestão ponderada para a população total	3,0/1,3***	22/6,6***	

Estas informações, os dados e tabelas apresentadas encontram-se explanadas nos relatórios da UE referidos como “*Reports on tasks for scientific cooperation - Report of experts participating in Task 3.2.7 (January 2002) (para a ocratoxina A); Task 3.2.8 (March 2002) (para a Patulina) e Task 3.2.10 (April 2003) (para as toxinas de Fusarium) Assessment of dietary intake of (ochratoxin A, patulin e Fusarium toxins) by the population of EU Member States*”.

3 METODOLOGIAS ANALÍTICAS USADAS NA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

3.1 GENERALIDADES

Como atrás referido, existe um grande número e uma grande variedade de micotoxinas encontradas, essencialmente, em produtos agrícolas utilizados como alimentos ou matéria prima para produtos destinados à alimentação animal e humana, mas novas (mico)toxinas vão sendo identificadas à medida que se vão aperfeiçoando e/ou desenvolvendo novos métodos analíticos com limites de detecção cada vez mais baixos.

A detecção e quantificação de micotoxinas nas rações e géneros alimentícios é importante com vista à desintoxicação dos produtos contaminados ou à sua rejeição, no sentido de prevenir o seu eventual consumo, com a consequente salvaguarda e protecção da saúde pública e animal.

A desintoxicação e descontaminação nem sempre são a mesma coisa. O facto de uma toxina não ser ou não poder ser detectada nos alimentos para seres humanos ou nas rações para animais, pelos métodos analíticos existentes, não significa que o produto seja inócuo ou tenha sido desintoxicado. Além disso, a desintoxicação refere-se apenas a tratamentos pós-colheita delineados para remover, reduzir ou anular os efeitos tóxicos das micotoxinas (*in* <http://www.fao.org/DOCREP/X2100T/X2100T05.HTM>).

A FAO publicou (em 2003) um manual de HACCP para o controlo de micotoxinas, para prevenir e controlar os potenciais riscos associados à contaminação dos produtos alimentares com microrganismos patogénicos e químicos tóxicos. Os programas de segurança alimentar usam rotineiramente a informação sobre os factores que conduziram à contaminação, de modo a estabelecer procedimentos preventivos e de controlo, para assim fornecer ao consumidor, produtos seguros (*in* <http://www.fao.org/docrep/005/y1390e/y1390e00.htm>).

Como é por demais reconhecido, as micotoxinas são produzidas por fungos que perante condições adversas produzem esporos resistentes, com uma camada protectora e tecidos de

reserva alimentar no seu interior, o que lhes permite aguardar pelas condições adequadas ao seu desenvolvimento. Por outro lado, as contaminações dos produtos agrícolas por micotoxinas ocorrem, normalmente, numa gama de concentrações extremamente baixa (na ordem dos ppm ou ppb), pelo que a sua identificação e análise deverá envolver métodos analíticos com elevada sensibilidade. Há ainda a considerar o facto de poderem estar presentes, num mesmo tipo de produto, diferentes espécies produtoras de micotoxinas e matérias interferentes, pelo que esse produto poderá ter que ser sujeito a diferentes métodos de análise para a quantificação de uma única micotoxina.

Dever-se-á ainda ter em mente que os valores obtidos por um laboratório, na determinação analítica de uma certa quantidade de uma micotoxina, não são rigorosamente exactos, pois os valores determinados são afectados de uma incerteza que advém do método, reagentes, instrumentos utilizados e pessoal técnico envolvido na análise.

A legislação e os regulamentos existentes para os alimentos (tanto para animais como humanos) requerem a existência de métodos de controlo fiáveis e validados. Para além da fiabilidade é desejável a simplicidade, o que influirá na disponibilidade e no volume de dados gerados e sobre a eficácia das medidas que se adoptem. A validação dos métodos é feita de acordo com um protocolo harmonizado de estudos colaborativos, que são sujeitos aos ensaios de avaliação conjunta e para os quais as características de performance tais como a recuperação, repetibilidade (*r*) e reprodutibilidade (*R*) têm que ser determinadas.

Sempre que possível, os laboratórios que fornecem os dados analíticos para determinados fins específicos (e.g., regulamentação, vigilância e controlo) devem ter sido acreditados por uma entidade reconhecida, para assegurar que aqueles aplicam um sistema de garantia da qualidade analítica. Tal sistema deve incluir, quando possível, o uso sistemático de materiais de referência ou de materiais de referência certificados (MRC) e a participação regular em estudos de comparação interlaboratorial.

A **Tabela 3.1** apresenta uma lista dos materiais de referência para um certo número de micotoxinas, que contêm quantidades confirmadas da substância de interesse, avaliados pelo Comité Comunitário de Referência, e que têm vindo a ser produzidos desde os anos

80. O *Bureau Comunitaire de Reference* (BCR) da União Europeia, o Centro de Investigações Conjuntas/Instituto de Materiais e Medidas de Referência da Comissão Europeia fornece estes materiais de referência, para micotoxinas, a nível mundial.

Tabela 3.1 - Lista dos materiais de referência para micotoxinas, actualmente disponíveis

Material de Referência Certificado	Já disponível	Em desenvolvimento
Aflatoxina M1 em leite em pó	x	
Aflatoxina M1 para calibrar	x	
Aflatoxinas totais em manteiga e bagaços de amendoim		x
Aflatoxina B1 em farinha de amendoim	x	
Aflatoxina B1 em rações	x	
Ocratoxina A em trigo	x	
DON em farinhas de milho e trigo	x	
Zearalenona em milho	x	
Zearalenona para calibrar	x	
Tricoteceno para calibrar		x

Nota: Materiais elaborados pelo Comité Comunitário de Referência, em Dezembro de 2003

Para a aflatoxina M1 em leites existem quatro tipos de MRC; três deles correspondem aos limites máximos de aflatoxina M1 em leites, impostos pela UE; o outro tem uma quantidade da referida toxina próxima do limite de detecção dos métodos utilizados para a sua determinação e para testes de recuperação.

Para a aflatoxina B1 em manteiga de amendoim existem dois MRC, um para a determinação do limite de detecção e testes de recuperação e outro relativo a níveis mais elevados de aflatoxina (10 µg/kg). Existem também três tipos de MRC com diferentes níveis de contaminação com aflatoxina B1 em bagaços de amendoim e MRC com dois níveis diferentes de contaminação com AFB1 para alimentos compostos para animais.

Para o desoxinivalenol (DON) existem quatro tipos de MRC, para farinhas de trigo e milho, com dois níveis diferentes de contaminação (nível baixo e nível médio). Para a ocratoxina A existem dois tipos de MRC para o trigo, com dois níveis diferentes de contaminação (nível baixo e nível médio).

Os materiais de referência certificados são relativamente caros e as quantidades disponíveis são limitadas. Como tal, é aconselhável que os laboratórios desenvolvam os

seus próprios materiais de referência para uso rotineiro, cujo conteúdo de toxina deverá ser estabelecido de acordo com os materiais de referência certificados (*in* <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e06.htm>).

A participação em programas de ensaios de comparação interlaboratorial, onde se incluem esquemas para avaliar a competência dos laboratórios no que se refere à análise de micotoxinas, está a tornar-se cada vez mais importante enquanto parte das medidas de garantia da qualidade analítica que um laboratório deve empreender para demonstrar um desempenho aceitável. Como exemplo, é de referir os programas organizados pela *Food Analysis Performance Assessment Écheme* (FAPAS) e operados pela *Central Science Laboratory*, no Reino Unido e Irlanda do Norte ou os organizados pela *American Oil Chemists' Society* (AOCS), nos Estados Unidos (AOCS, 2003).

A adopção das boas práticas na amostragem e o uso de métodos validados, juntamente com a acreditação e a participação em ensaios interlaboratoriais idóneos, são meios recomendados para assegurar o reconhecimento dos resultados da análise de micotoxinas em todo o Mundo e requisitos prévios para um cumprimento adequado das disposições legais (*in* <http://www.fao.org/docrep/W9474T/w9474t03.htm>).

Os métodos analíticos para determinação de micotoxinas baseiam-se fundamentalmente, em propriedades específicas destas, nomeadamente:

- a sua solubilidade em solventes orgânicos polares;
- a possibilidade de, naturalmente ou após derivatização, as micotoxinas originarem substâncias que produzem fluorescência.

Contudo, devido à diversidade das estruturas químicas e das propriedades físico-químicas das micotoxinas, os processos para as analisar variam consideravelmente. Por outro lado, essa análise torna-se ainda mais difícil devido à distribuição heterogénea das micotoxinas nas amostras contaminadas e devido à interferência da matriz em que as mesmas se encontram. Isto leva a que seja insofismável que se disponha de métodos de detecção e quantificação eficazes, que permitam controlar efectivamente, tanto nos países exportadores como nos países importadores, uma larga gama de micotoxinas.

O objectivo da resenha que se pretende reunir neste capítulo, é organizar a informação relacionada com a análise e determinação de micotoxinas, nomeadamente os métodos usados mais relevantes e os limites de detecção desses métodos.

A [Directiva 98/53/CE](#) da Comissão, de 16 de Julho de 1998, fixa os métodos de colheita de amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes nos géneros alimentícios e o [Regulamento \(CE\) n.º 401/2006](#) da Comissão, de 23 de Fevereiro de 2006, estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios.

Existem essencialmente dois tipos de métodos de análise, tendo em conta o fim a que se destinam: os métodos qualitativos e os métodos quantitativos. Os qualitativos analisam e determinam a presença ou não de micotoxinas. Normalmente fornecem apenas um teor semi-quantitativo. A sua aplicação tem maior interesse nos locais de recepção e armazenamento de matérias-primas e pode permitir um primeiro despiste das amostras contaminadas. Os métodos quantitativos detectam e medem a quantidade de micotoxinas presentes numa amostra. São, no entanto, menos económicos e mais demorados, além de ser necessário pessoal técnico especializado.

A análise laboratorial de micotoxinas é uma tarefa algo difícil, uma vez que, usualmente, apenas estão presentes em pequenas quantidades nas amostras. Os métodos de análise, ditos convencionais, para a pesquisa, identificação, detecção e quantificação de micotoxinas englobam, de um modo geral as seguintes etapas: amostragem, preparação da amostra, extracção, purificação, separação, detecção, confirmação e quantificação, conforme apresentado na Figura 3.1.

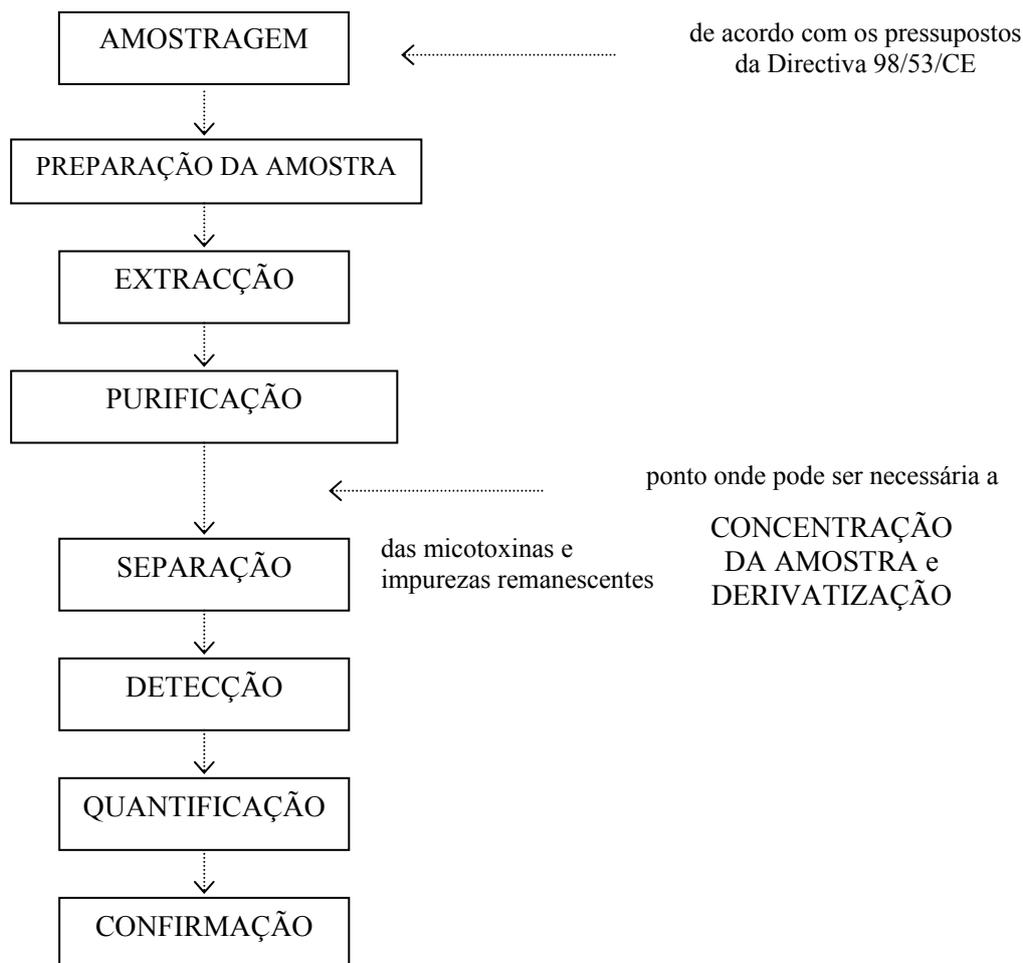


Figura 3.1 - Esquema (simplificado) com as principais etapas na análise de micotoxinas

Os procedimentos básicos, normalmente, envolvem técnicas de identificação e quantificação de micotoxinas que os tornam demorados e complexos, para além de envolver meios dispendiosos, necessitando ainda de pessoal qualificado e devidamente habilitado para os executar.

Com os progressos verificados na instrumentação e análise de micotoxinas, têm-se desenvolvido métodos que apresentam maior eficácia e com limites de detecção cada vez mais baixos. Por outro lado, como são de mais fácil e rápida execução, permitem uma resposta mas rápida.

São três as técnicas que são preferencialmente usadas na análise e detecção de micotoxinas: o HPLC, o TLC e o método imunológico ELISA.

Na **Tabela 3.2** , apresentam-se de um modo muito resumido, as vantagens e desvantagens de alguns métodos analíticos usados para detectar e quantificar micotoxinas.

Tabela 3.2 - Métodos analíticos usados na determinação de micotoxinas

<i>Análise</i>	<i>Método</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
Cultura de fungos e identificação	Cultura microbiológica; testes de identificação microscópica ou bioquímica	Determina a presença de fungos, mas não necessariamente as estirpes toxigénicas.	Não determina se os fungos encontrados podem ou estão a produzir micotoxinas. Pode levar muito tempo para completar o teste, pelo que pode ser demorada a obtenção de resultados.
Análises químicas	Teste ELISA	Rápido, relativamente barato.	Apenas detecta uma micotoxina de cada vez. Normalmente são necessários testes adicionais para confirmar a presença da micotoxina.
	Cromatografia em camada fina (TLC)	Pode detectar mais do que um tipo de micotoxina.	Mais lento do que o teste ELISA. Poderão ser necessários testes adicionais para confirmar a presença da micotoxina. Pode não funcionar tão bem para as rações como para outros grãos.
	Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	Facilidade em fornecer resultados quantitativos; poderá ser capaz de detectar mais do que um tipo micotoxina.	Pode ser mais caro do que outros métodos de análise. Poderão ser necessários testes adicionais para confirmar a presença da micotoxina.
	Cromatografia gasosa /espectrometria de massa (GC/MS)	Pode identificar a micotoxina sem outros testes adicionais; poderá ser capaz de detectar mais do que um tipo micotoxina.	Mais caro do que outros métodos de análise.

3.1.1 Validação de Métodos

Os métodos usados devem ser validados e responder aos critérios para a selecção de métodos de análise para micotoxinas publicados em 1999 pelo Comité Europeu da Normalização (CEN). Estes incluem a repetibilidade, a reprodutibilidade e os níveis de recuperação mínimos. Por exemplo, as recuperações para o DON, ZEA e FUM devem estar entre 70 e 110% (Méllotte, 2004).

Várias organizações internacionais estão envolvidas na validação de métodos analíticos, incluindo a *Association of Official Analytical Chemicals (AOAC International)*, a Organização Internacional de Normalização (ISO), o seu equivalente europeu - o Comité

Europeu de Normalização (CEN) e a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), que contam já com vários métodos normalizados de análises de micotoxinas, validados por estudos interlaboratoriais, que se realizam em número gradualmente crescente. Uma das últimas edições dos Métodos Oficiais de Análises da AOAC Internacional contém aproximadamente 40 métodos validados para determinações de micotoxinas e foi recentemente publicado uma revisão sobre a validação de métodos de análises para micotoxinas (Gilbert and Anklam, 2002).

O uso de métodos analíticos validados é também fundamental para assegurar que os resultados das análises fornecem uma avaliação de confiança e consistente, pois terão de ter sido validados para o desempenho analítico pretendido em estudos colaborativos interlaboratoriais, em que características como a exactidão, a precisão, a especificidade, entre outras, foram testadas. No entanto, o seu uso não é nenhuma garantia de resultados fiáveis. Além disso, nem sempre pode ser possível usar um método oficial, ou porque não é apropriado para uma combinação particular da toxina-matriz, ou porque alguns reagentes e instrumentos não estão disponíveis, ou ainda porque não é rentável nem praticável.

Ao solicitar uma análise de micotoxinas a ser realizado num laboratório externo, é muito importante assegurar que este usa métodos validados e é acreditado para esta análise, numa matriz definida (por ex. cerveja, malte, cevada).

Na análise de micotoxinas existem características específicas dos métodos que condicionam a sua escolha, pelo que tem que se ter em conta e que são a seguir apresentadas.

Recuperação – traduzida pela quantidade de toxina detectada através da aplicação do método em causa a uma amostra inicialmente não contaminada e na qual foi incorporada uma quantidade conhecida dessa toxina. Valores de recuperação da toxina inferiores a 70 ou 80% deverão conduzir à rejeição desse método;

Precisão – o método deve apresentar elevada reprodutibilidade (reduzida variação de resultados obtidos em diferentes laboratórios com a mesma amostra) e elevada repetibilidade (reduzida variação de resultados obtidos no mesmo laboratório com a mesma amostra);

Limite de detecção – representa a mais baixa quantidade de toxina que se pode detectar com o método em causa. Logicamente, o método será tanto melhor quanto mais baixo for esse valor;

Limite de quantificação – representa a mais pequena quantidade de toxina que se consegue quantificar, com segurança, com o método em questão; este parâmetro está, naturalmente, relacionado com o limite de detecção;

Sensibilidade – representa a mais pequena variação de quantidade de toxina susceptível de ser detectada pelo método em causa;

Robustez – traduz a estabilidade dos resultados obtidos pelo método quando se lhe introduzem pequenas alterações;

Exactidão – concordância entre o valor do analito determinado pelo método e o seu verdadeiro valor. A exactidão pode ser verificada recorrendo à análise de materiais de referência, a ensaios interlaboratoriais, à adição aos produtos a analisar de quantidades conhecidas de um dado padrão ou à comparação com valores obtidos com um método já estudado e comprovadamente considerado como dando bons resultados.

3.2 AMOSTRAGEM E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

O método de amostragem é uma etapa crucial porque a contaminação por micotoxinas pode ocorrer tanto no campo, como durante o armazenamento e a sua produção não é homogénea. Por exemplo, a contaminação com a ocratoxina A ocorre frequentemente de uma forma salpicada durante o armazenamento (silos). Assim, um produto (alimentar ou agrícola) sobre o qual se suspeite estar contaminado por micotoxinas deverá ser submetido a um rigoroso processo de amostragem, pois tem que ser representativa do lote em análise pelo facto das micotoxinas não estarem distribuídas de um modo uniforme nos produtos contaminados, existindo por exemplo, grãos mais contaminados que outros. Como tal, um procedimento menos cuidado de amostragem do lote pode deixar de fora grãos altamente infectados.

A Comissão Europeia publicou uma [Directiva 2002/26/CE](#) que fixa os métodos de amostragem e os métodos de análise para o controle oficial dos níveis da ocratoxina A nos géneros alimentícios, recomendando um procedimento harmonizado para a amostragem de

acordo com o tamanho do lote. Os resultados obtidos, de amostras não seleccionadas por este método, são geralmente sub-estimados.

A FAO sugere numa publicação de 1993 - *Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn*. FAO – *Food and Nutrition paper*, 55 - indicações sobre o procedimento correcto para a realização de uma amostragem de amendoins e milho para posterior análise da aflatoxina. Uma amostragem considerada ideal é aquela que pode ser efectuada de um modo contínuo, ao longo do processo de produção ou que resulta da mistura de amostras retiradas aleatoriamente de diferentes procedências. Em Portugal, existe a Norma Portuguesa 3256 de 1988 que diz respeito à colheita de amostras em alimentos para animais.

A preparação da amostra envolve uma moagem e homogeneização existindo uma Norma CEN de 1994 (*Foodstuffs quantitative determination of Ocratoxin A*) para amostras de milho, cevada e sêmea de trigo. Esta moagem e homogeneização é importante, principalmente no caso dos cereais, por as micotoxinas se encontrarem sobretudo na zona do pericarpo dos grãos.

A amostragem e a preparação da amostra permanecem uma fonte considerável de erro na identificação analítica de aflatoxinas. Aproximações sistemáticas à amostragem, à preparação de amostra e análise são de absoluta necessidade, para determinar aflatoxinas ao nível das partes-por-bilhão. Deste modo, foram desenvolvidos e rigorosamente testados planos de amostragem específicos para alguns produtos tais como milho, amendoim e nozes, a partir dos quais foram modelados planos para outros tipos de produtos.

Uma característica comum a todos os planos de amostragem é que a amostra inteira deve ser moída e misturada, de modo a que a porção analítica a analisar tenha a mesma concentração de toxina que a amostra original (*in* <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html>).

3.3 EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO

A melhoria recente mais significativa na etapa de purificação é o uso da extracção em fase sólida. Os extractos são limpos antes de análise instrumental (camada fina ou cromatografia líquida) para retirar os materiais co-extractados que frequentemente interferem na determinação do analito alvo. Enquanto que a purificação não é (usualmente) necessária nos imunoensaios, procedimentos extensivos de purificação são necessários antes da utilização de métodos físico-químicos.

A extracção e remoção das micotoxinas das amostras são conseguidas utilizando solventes orgânicos nos quais se solubilizam. Normalmente, as micotoxinas são solúveis em solventes polares e fracamente polares, sendo insolúveis em solventes apolares. Em laboratório usam-se misturas de solventes orgânicos (acetona, acetonitrilo, clorofórmio, diclorometano, acetato de etilo ou metanol) em combinação com pequenas quantidades de um ácido ou água. A adição de ácidos ou de água melhoram o rendimento da extracção pois alteram o pH do meio e promovem uma melhor repartição das micotoxinas no solvente, respectivamente. Não se consegue definir uma metodologia de extracção comum a todas as micotoxinas, devido às diferentes propriedades e características físico-químicas (solubilidade, coeficiente de partição, entre outras) o que lhes atribui um comportamento específico nos vários solventes.

O uso de solventes clorados está constantemente a diminuir e o acetonitrilo, em particular, tornou-se no solvente mais popular para a extracção. As misturas de solventes mais comumente usadas para a extracção são o metanol/água (3:1) e acetonitrilo/água (1:1). As misturas podem ser usadas tanto em cartuchos de fase reversa (C_{18}) ou em colunas de troca aniónica forte (SAX). Os cartuchos de fase reversa (C_{18}) são úteis para a determinação de produtos da hidrólise, embora gerem extractos menos puros. Podem também ser usados, quando as colunas de SAX dão recuperações pobres.

Mais recentemente, tornaram-se disponíveis as colunas de imunoafinidade (IAC) apresentando uma selectividade elevada. As moléculas do analito são ligadas aos anticorpos e a toxina pode subsequentemente ser eluída. Por exemplo, para as fumonisinas,

de modo a permitir a extracção quantitativa e a purificação a partir de outras matrizes para além do milho, foi proposto um número de diferentes misturas de solventes: metanol/borato tampão (3:1, pH 9.2), acetonitrilo/metanol/água (1:1:2) e metanol/HCl 0.1 M (3:1) (*in* <http://www.micotoxinas.com.br/fumofacts.htm>).

Os solventes mais usualmente utilizados na extracção de algumas micotoxinas são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Solventes de extracção mais utilizados

micotoxinas	Solventes de Extracção
Aflatoxinas	acetonitrilo/água, metanol/água
Fumonisinias	acetonitrilo/água (1:1), metanol/ água (3:1)
Ocratoxina A	acetonitrilo/água, MTBE, clorofórmio, misturas de tolueno/HCl/MgCl ₂
Patulina	acetato de etilo, acetona
Tricotecenos Tipo A	acetonitrilo/água, metanol/água
Tricotecenos Tipo B	acetonitrilo/água, água/PEG, clorofórmio/metanol
Zearalenona	acetato de etilo, metanol, acetonitrilo, clorofórmio ou misturas destes

Tendo-se extraído as micotoxinas da amostra, tem que se proceder à respectiva purificação pois os solventes extraem as micotoxinas juntamente com outras substâncias, tais como pigmentos, gorduras, etc. A purificação da amostra é a remoção de substâncias, que podem interferir com a detecção do analito. Frequentemente é também usado para a pré-concentração deste, a redução da quantidade de solvente.

Os componentes da matriz tais como os lípidos, hidratos de carbono e proteínas que estão normalmente presentes no extracto, tornam necessário um passo adicional de purificação, precedendo a separação e detecção. Nesta etapa é usado um dos seguintes processos: colunas de imunoafinidade (IAC), colunas de permuta iónica ou extracção em fase sólida (SPE).

Existem métodos que sugerem o desengorduramento prévio da amostra quando a gordura ultrapassa determinados valores. Neste caso, é necessário algum cuidado pois a utilização de solventes extractantes de gordura pode levar à perda quase completa das micotoxinas. A

separação da gordura por centrifugação é a que tem apresentado melhores resultados. Actualmente e com o aperfeiçoamento das técnicas usadas, as fases de separação, detecção e confirmação encontram-se reunidas numa única etapa. Os avanços e melhorias verificadas ao nível das técnicas analíticas têm permitido uma melhor identificação das micotoxinas com maior exactidão e reprodutibilidade.

3.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Estão disponíveis diversos métodos de análise, diferentes entre si, para as micotoxinas identificadas e caracterizadas, e aquele(s) que for(em) escolhido(s) por um laboratório irá(ão) variar dos outros, uma vez que cada um deles pode usar mais do que um método, dependendo das circunstâncias. Alguns laboratórios podem examinar as amostras para detectar a presença de micotoxinas, usando um método de análise relativamente rápido, fácil e barato. O custo das análises de micotoxinas depende em parte do método usado para detectar a sua presença. Ao comparar o custo entre laboratórios, é importante saber se os métodos usados pelos laboratórios são similares ou não e se se encontram validados.

Alguns métodos de análise de micotoxinas são capazes de detectar várias micotoxinas diferentes num único teste, enquanto outros detectam apenas uma micotoxina. Uns podem determinar a concentração das micotoxinas presentes, enquanto outros não. Se essa análise detectar alguma micotoxina presente, então a amostra é de novo analisada usando um outro método que possa confirmar a presença de micotoxinas e determinar a quantidade presente. Cada grupo de compostos e cada substrato têm várias propriedades químicas e físicas, pelo que os métodos para a separação de toxinas dos substratos devem ser desenvolvidos caso a caso. Por exemplo, é totalmente diferente analisar aflatoxina em manteiga de amendoim e identificar a toxina T-2 no grão de milho. Por outro lado, as micotoxinas são frequentemente produzidas em concentrações vestigiais, o que faz com que a sensibilidade dos sistemas de detecção seja também um factor essencial. Se são necessários limites de detecção muito baixos, os métodos de fluorescência são ainda os mais indicados, devido à sua sensibilidade extremamente elevada. Existem dois grupos de métodos: cromatográficos e imunológicos.

Os métodos cromatográficos medem o composto especificamente após a extracção da amostra e purificação do extracto, seguidas de uma separação por cromatografia gasosa ou líquida e uma detecção específica. A purificação de extracto numa coluna de imunoafinidade (IAC) é cada vez mais habitual. Os métodos oficiais de cromatografia de camada fina (TLC) do AOAC já quase não são usados (Méllothe, 2004).

Os métodos imunológicos são baseados no princípio do método ELISA. Os conjuntos de *kits* para executar o teste ELISA estão disponíveis a partir de vários fornecedores (R-Biopharme, Rhone Diagnostix, International Diagnostic Systems Corp., Diffchamb, Neogen, Tepnel, Tome Laboratories and ELISA-technologies) e são frequentemente usados para fins de rastreio e/ou no campo. Existem várias versões que variam na rapidez do procedimento e na quantificação dos resultados.

Um passo muito importante da validação do método é a detecção dos efeitos da matriz, e porque o falso positivo pode acontecer, os resultados positivos poderão requerer a confirmação por métodos cromatográficos mais caros. Alguns autores estudaram a sua correlação com os métodos cromatográficos. Os limites de detecção relatados pelo princípio ELISA eram sempre mais altos do que os dos métodos cromatográficos (Méllothe, 2004).

Existem vários sistemas de detecção, químicos e biológicos, para a determinação de micotoxinas. As toxinas mais proeminentes são as aflatoxinas, desoxinivalenol (DON), zearalenona, ocratoxina, fumonisina e patulina (van der Gaag et al., 2003) e vários sistemas biológicos foram desenvolvidos para detectar estas toxinas. Embora estes métodos sejam úteis para a determinação da quantidade de micotoxina, eles falham na especificidade, pelo que a identificação da micotoxina é geralmente executada por um dos seguintes métodos físico-químicos ou imunológicos.

3.4.1 Métodos Cromatográficos

Os métodos tradicionais usaram solventes para os passos de purificação, a detecção visual e técnicas cromatográficas variadas para a quantificação. No presente, os mesmos métodos são ainda usados, mas novos métodos usam o que se tem aprendido dos sistemas

biológicos, tendo recentemente sido desenvolvidos os ensaios imunológicos que podem ser aplicados a amostras com pouca ou nenhuma purificação (Bennet and Klich, 2003).

Apresentam-se em seguida, de um modo muito resumido, alguns métodos analíticos usados para detectar e analisar micotoxinas: o TLC, o HPLC, o GC e o método imunológico de ELISA.

3.4.1.1 Cromatografia líquida de Alta Performance (HPLC)

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou cromatografia líquida a alta pressão como inicialmente foi chamada, tornou-se disponível na análise de produtos alimentares nos inícios dos anos setenta e rapidamente foi ganhando importância na determinação de micotoxinas, particularmente quando vários tipos de colunas e de detectores (nomeadamente, os de fluorescência) se tornaram disponíveis. A introdução de amostradores automáticos e sistemas computadorizados de recuperação de dados tornou o HPLC muito útil na análise em larga escala.

A detecção é efectuada por meio de detectores de U.V. ($\lambda=254$ nm ou 265 nm), mas no entanto a detecção U.V. não é muito selectiva e os limites de detecção para as aflatoxinas são muito superiores aos obtidos com TLC. Consequentemente, o uso de detectores U.V. em ensaios com aflatoxina foi descontinuado quando detectores mais selectivos (de fluorescência) se tornaram disponíveis. Inicialmente, estes detectores também tiveram limitações, uma vez que as aflatoxinas B1 e B2 não exibem forte fluorescência em solventes de fase normal e a B1 e G1 não exibem forte fluorescência em solventes de fase reversa.

Na maioria dos procedimentos, é aplicada a detecção por U.V., porém para várias micotoxinas (i.e., ocratoxina A, zearalenona, alguns *ergot alkaloids* e algumas toxinas de *Alternaria*) foram os detectores por fluorescência que se revelaram úteis. Assim, a cromatografia líquida de alta performance tem vindo a substituir (parcialmente) a cromatografia de camada fina na análise de micotoxinas em alimentos.

As razões para este desenvolvimento são evidentes. As separações são normalmente muito melhores do que as obtidas com um TLC unidimensional; os métodos de HPLC fornecem geralmente boa informação quantitativa, sendo considerado o método mais sensível para identificar, com precisão, os diferentes tipos de micotoxinas, apresentando pois um superior desempenho e uma maior fiabilidade quando comparado com o TLC e o equipamento utilizado pode facilmente ser automatizado. Por outro lado, tornou-se possível o acoplamento *online* a um espectrómetro de massa.

No entanto, o HPLC também apresenta algumas limitações. O custo do equipamento e de operação é mais elevado do que para o TLC. A extensa experiência de laboração que é necessária para obter o benefício máximo de um sistema de HPLC constitui uma outra limitação, visto que o TLC pode ser aprendido com relativa facilidade não havendo necessidade de pessoal altamente qualificado.

Não se deve tomar como um dado adquirido que o uso do HPLC é sempre melhor do que o TLC na análise de micotoxinas. É um dever do analista descobrir que técnica fornece os melhores resultados tendo em vista os objectivos propostos (van Egmond and Paulsch, 1986).

A cromatografia líquida de alta performance pode ser uma alternativa atraente à cromatografia de camada fina, pois oferece a possibilidade de automatizar as etapas (cruciais) de separação e quantificação. No entanto, esta técnica (mais onerosa) não demonstrou conduzir a melhores resultados na análise de micotoxinas do que a cromatografia de camada fina.

Foram desenvolvidos métodos de HPLC para quase todas as micotoxinas que se encontram frequentemente nos cereais e outros produtos agrícolas, no entanto, o TLC permanece como o método preferencial quando o objectivo é a selecção rápida.

A cromatografia líquida (LC) é similar à TLC em muitos aspectos, incluindo a aplicação da amostra, a fase estacionária e a fase móvel, complementam-se mutuamente, não sendo

fora do comum, um analista usar o TLC num trabalho preliminar para otimizar as condições de separação por LC.

Os métodos de cromatografia líquida para a determinação de micotoxinas em alimentos incluem a cromatografia líquida em fase normal (NPLC), cromatografia líquida em fase reversa (RPLC) com derivatização pré-coluna (BCD), RPLC seguida de derivatização pós-coluna (PCD) e RPLC com detecção electroquímica.

3.4.1.2 Cromatografia em camada fina (TLC)

A cromatografia em camada fina é o método físico-químico mais comumente utilizado na análise e determinação de micotoxinas pois trata-se de um método de multidetecção (mais do que uma micotoxina pode ser detectada por amostra) pelo qual se podem determinar a maioria das micotoxinas de interesse. Mediante este método consegue-se quantificar laboratorialmente, entre outras, as seguintes micotoxinas com os correspondentes limites de detecção (LD): aflatoxinas, 2.5 µg/kg; ocratoxina A, 50 µg/kg; citrinina, 6 µg/kg; zearalenona, 80 µg/kg; T-2, 280 µg/kg; patulina 150 µg/kg. É baseada na separação de compostos em função da distância que migram sobre uma matriz específica com um eluente específico. A distância que um dado composto percorrerá nesse eluente é característica e única para cada composto específico. Foram já determinados os factores de retenção (R_f) para a maioria das micotoxinas. Tal como acontece com qualquer sistema de detecção, deve ser corrido em paralelo um controlo positivo contendo as micotoxinas puras para assegurar a precisão, pois várias substâncias químicas podem ter um R_f similar. A extracção das micotoxinas realiza-se com um único eluente, utilizando-se posteriormente eluentes de desenvolvimento específicos e reacções de identificação selectivas para cada uma das micotoxinas.

Nos primeiros anos de investigação sobre micotoxinas, a cromatografia de camada fina (TLC) foi uma técnica muito popular e comumente usada para separar os componentes do extracto e ainda hoje existem numerosas aplicações. Inicialmente as separações foram realizadas numa única dimensão, i.e., usando um único solvente (de desenvolvimento). Posteriormente foi introduzido o TLC bidimensional.

Trata-se de uma técnica de separação poderosa, pois é efectuado um segundo desenvolvimento usando um outro solvente diferente mas correlacionado. O extracto da amostra é colocado numa ponta do prato/placa de TLC e são executadas duas progressões paralelas aos dois lados do prato. Isto possibilita uma melhor separação (do que o TLC unidimensional) e é especialmente útil naqueles casos em que níveis muito baixos têm que ser detectados.

Na cromatografia de camada fina pode ser usada uma vasta gama de formatos e adsorventes. Nos ensaios com micotoxinas são frequentemente usados pratos/placas de TLC de sílica gel, uma vez que este tipo de adsorvente oferece, geralmente, a melhor possibilidade de separar a toxina de interesse dos componentes da matriz. As placas de camada fina podem ser usadas em formatos diferentes. A maioria dos problemas de separação pode ser resolvida usando um prato quadrado de 20x20 cm; contudo o uso de pratos com 10x10 cm e mesmo com 7x7 cm também conduzirão a bons resultados; especialmente para procedimentos de separação bidimensionais, onde o uso dos pratos de tamanhos inferiores poupa muito tempo. A cromatografia de camada fina, embora uma técnica antiga para a determinação de micotoxina, continua a ser uma técnica de separação prática, relativamente simples, de confiança e com um amplo campo de aplicação. A sua aplicação bidimensional oferece uma resolução especialmente boa, conduzindo a limites de detecção mais baixos.

As vantagens do TLC são a precisão e o baixo custo do seu equipamento e materiais - cerca de metade do custo dos métodos mais técnicos e evoluídos e aproximadamente 25% do custo dos *kits* de ELISA (in <http://www.grainscanada.gc.ca/Cdngrain/fusarium/workshop/2003/3rdCWFHB-2003.pdf>), enquanto que as desvantagens são a necessidade de uma preparação cuidadosa da amostra e extracção similares às usadas no métodos cromatográficos mais técnicos e o tempo mais demorado para determinar níveis baixos da micotoxina. Existe um artigo de Lin et al. (1998) onde é evidenciada a aplicabilidade do TLC à análise de micotoxinas em amostras das mais variadas matrizes, realçando os méritos desta técnica na determinação qualitativa e quantitativa das micotoxinas mais conhecidas. É também apresentada uma comparação entre diferentes métodos de TLC e com o HPLC, com os métodos de GC e ensaio *enzyme-linked immunosorbent*.

O TLC é uma técnica vantajosa numa fábrica de grande processamento que faz testes de rotina, envolvendo amostras múltiplas. Trata-se de uma técnica cromatográfica usada na separação, avaliação da pureza e identificação de compostos orgânicos. Devido à sua simplicidade e rapidez, é também usada para controlar o progresso de reacções orgânicas. Esta técnica encontrou um uso difundido na determinação de micotoxinas, mas tem sido substituído por outros métodos cromatográficos, por exemplo, HPLC e GC, por causa do desempenho analítico superior que estas apresentam. No entanto, nos países que não têm à disposição o equipamento necessário e que é caro, mas que produzem e exportam produtos agrícolas, o TLC mantém-se como uma técnica importante pois não carece de trabalho intensivo, nem de operadores muito qualificados. Por outro lado, o TLC é usado também para verificar resultados de técnicas novas/recentes e mais rápidas.

3.4.1.3 Cromatografia gasosa (GC)

A cromatografia gasosa (GC) é um método quantitativo que pode identificar, com exactidão, algumas micotoxinas, sendo no entanto, o seu uso rotineiro limitado a um reduzido número de micotoxinas. Isto deve-se ao facto da maioria das micotoxinas não ser volátil ou apresentar uma volatilidade insuficiente, ou pela fraca absorção no UV-VIS, necessitando portanto de uma etapa de derivatização antes de serem analisadas. Além disso, o facto de muitas das micotoxinas serem facilmente detectadas e quantificadas a baixos níveis de concentração, usando o TLC ou o HPLC, não tem estimulado o desenvolvimento deste tipo de técnica.

Embora alguns métodos de cromatografia gasosa para a detecção e quantificação de patulina em sumo de maçã, ácido penicílico em milho e em arroz e zearalenona em milho, se tenham tornado disponíveis nos anos 70, a única vantagem significativa sobre o TLC e HPLC é a possibilidade de usar acoplado, espectrómetros de massa como detectores altamente selectivos e sensíveis.

Quando operando no modo de monitorização do ião seleccionado, o espectrómetro de massa é um detector muito selectivo e sensível, que pode ser usado em ensaios quantitativos de micotoxinas em vários produtos. O uso de GC-MS no modo de monitorização do ião seleccionado tem sido relatado, não apenas para a determinação dos

tricotecenos, mas casualmente também para várias outras micotoxinas. Contudo, o uso deste sofisticado sistema é limitado aos laboratórios que têm possibilidades em adquirir estes equipamentos computadorizados caros (van Egmond and Paulsch, 1986).

A utilização da cromatografia gasosa é limitada principalmente à análise de tricotecenos. Graças à evolução técnica, a cromatografia gasosa tornou-se uma poderosa técnica na determinação de toxinas deste grupo. A cromatografia gasosa/espectrometria de massa no modo de monitorização do ião seleccionado é actualmente o pico da sofisticação metodológica e pode ser usado para detectar e confirmar a presença de micotoxinas na gama do pg/Kg, com um alto grau de certeza e confiança (van Egmond and Paulsch, 1986).

Foram relatadas metodologias usando o GC para a PAT, ZEA e esterigmatocistina, mas não são largamente difundidas (in <http://www.ifa-tulln.ac.at/download/030827095121.pdf>). Como atrás referido, trata-se de um método muito mais sensível que o método TLC na análise dos tricotecenos, identificando com exactidão o DON, a ZEA e a toxina T-2.

3.4.2 Métodos Imunológicos

A cromatografia de camada fina e os métodos LC para determinar aflatoxinas em produtos alimentares são laboriosos e demorados. Frequentemente, estas técnicas requerem conhecimento e experiência de técnicas cromatográficas para resolver problemas de separação e de interferência. Através de avanços da biotecnologia, encontram-se agora comercialmente disponíveis testes específicos baseados em anticorpos que podem identificar e quantificar micotoxinas em géneros alimentícios em menos de 10 minutos. Estes testes são baseados em afinidades dos anticorpos monoclonais ou policlonais com as toxinas. Os três tipos de métodos imuno-químicos são o ensaio radio-imunológico (RIA), o ensaio enzimo-imunológico (ELISA) e o ensaio com coluna de imuno-afinidade (IAC).

Por um acaso, nos anos 80, o ELISA foi aplicado na análise de amostras no âmbito do *Aflatoxin Check Sample Survey Programme*, patrocinado pela IARC em Lyon. Foi relatado que os resultados do ELISA, aplicado à análise de amostras de refeições de amendoim e de milho (naturalmente contaminadas com aflatoxinas em níveis calculados de 210 e 55 µg/kg, respectivamente) apresentavam uma excelente relação com os valores médios

obtidos por outros colaboradores usando o TLC e o HPLC, o que possibilitou um uso mais alargado do ELISA. A principal vantagem do ELISA é a possibilidade de automatização completa, tornando-a uma técnica muito valiosa nos procedimentos quantitativos rápidos.

Com os avanços que se verificam na instrumentação e tecnologia, as técnicas analíticas utilizadas na detecção de micotoxinas também estão em constante desenvolvimento. O teste ELISA, também conhecido como teste rápido, é uma técnica semi-quantitativa. Existem comercialmente disponíveis, vários *kits* de teste. Estes testes são populares porque não são caros, são fáceis de usar e os resultados podem ser obtidos em poucos minutos. Os ensaios imunológicos comercialmente disponíveis são produzidos e distribuídos pela r-Biopharm (Darmstadt, Alemanha) e Neogen (Lansing, MI, USA). As vantagens incluem uma exactidão boa, rápido tempo de análise e como os *kits* vêm completamente equipados tornam-se fáceis de usar em quase todos os laboratórios analíticos. Os custos elevados tornam inadequados para programas de monitorização e controlo.

Um teste positivo indica que está presente uma certa quantidade de toxina na amostra enquanto que um teste negativo indica que caso a toxina esteja presente, a sua concentração está abaixo do nível de detecção do teste ELISA. Vários *kits* do teste ELISA estão disponíveis para as aflatoxinas, fumonisinas, desoxinivalenol e zearalenona.

Os *kits* testam uma única micotoxina, pelo que é necessário um jogo distinto para cada uma delas. São baseados na interacção entre a micotoxina e os anticorpos produzidos contra a micotoxina. Se a micotoxina, para a qual o *kit* foi “delineado” para detectar, está presente em solução, a micotoxina liga-se aos anticorpos na placa. Depois de uma série de soluções serem adicionadas e removidas da placa, a presença da micotoxina é detectada com base numa mudança de cor na etapa final.

Alguns *kits* ELISA são projectados para determinar a concentração de micotoxina no grão. Outros são projectados para detectar a presença de micotoxina acima de uma concentração especificada, mas não podem ser usados para determinar o quanto acima dessa concentração está presente. Existem *kits* comerciais de análise baseados em métodos

imunológicos tais como o ELISA aprovado como método oficial da AOAC para triagem de aflatoxinas e o RIA.

A reacção de competição entre a aflatoxina e um produto enzimo-conjugado (colorido) indica a ausência de aflatoxina quando o resultado da prova é um sinal colorido e a presença das mesmas em caso de ausência de cor. Estas técnicas permitem o controlo das aflatoxinas *in situ* de um modo rápido, fiável e simples.

As moléculas pequenas, tais como as micotoxinas, não são imunogénicas e são conhecidas como moléculas que não estimularão a produção do anticorpo por si mesmas. No entanto, os anticorpos para uma micotoxina específica podem ser produzidos, conjugando-a com um portador da proteína, que faz com que a micotoxina se transforme num produto imunogénico. As várias formas dos anticorpos incluem os tipos policlonal e monoclonal. Os anticorpos policlonais reagem com os antígenos múltiplos ou haptenos num composto desconhecido, visto que os anticorpos monoclonais reagem somente com os antígenos ou os haptenos específicos. Actualmente, encontram-se já desenvolvidos ambos os tipos de anticorpos, policlonais e monoclonais, e disponíveis para identificar diversos tipos de micotoxinas em amostras utilizando o método ELISA e a cromatografia de imuno-afinidade (IAC).

3.4.3 Outros métodos

Em laboratório, podem e devem ser usados métodos mais sofisticados de análise de micotoxina por várias razões. Primeiro por poderem detectar micotoxinas em muitos e diferentes tipos de rações/alimentação para animais, e depois para detectá-los de um modo confiável e permitir que as concentrações das micotoxinas presentes possam ser determinadas com maior precisão.

Os métodos de rastreio/selecção (*screening*) são particularmente úteis se puderem ser efectuados de uma forma rápida, fácil e económica. Devem permitir a detecção de concentrações da micotoxina em estudo, tão baixas quanto aquelas detectadas pelos métodos quantitativos mais evoluídos. Teoricamente, os métodos de selecção não devem produzir resultados falso-negativos.

Os laboratórios requerem métodos simples, robustos e consistentes para a análise de rotina, com identificação inequívoca da micotoxinas suspeitas. São necessários métodos sensíveis, na ordem dos ng/g, que permitam detectar micotoxinas nos produtos alimentares de modo a proteger os consumidores, para providenciar dados sobre a exposição pela dieta e para avaliar a investigação científica no controlo dos fungos e subsequente produção das respectivas toxinas.

3.4.3.1 Detecção por U.V.

A radiação U.V. é baseada na fluorescência que a aflatoxina apresenta sob a acção da luz ultravioleta num comprimento de onda de 365 nm. Trata-se de uma técnica rápida comumente usada na determinação de uma possível contaminação de aflatoxina em milho. No entanto, a detecção por U.V. é um teste presuntivo pois não diz se a aflatoxina está presente. A experiência demonstrou que os resultados obtidos, raramente são falsos negativos, mas dão frequentemente falsos positivos. As amostras julgadas como sendo positivas (em aflatoxinas) pela luz preta devem ser analisadas por um método mais fiável para confirmar a presença da aflatoxina e para determinar a concentração em que esta está presente.

Uma cor verde brilhante-amarela fluorescente (BGYF) indica a presença de *Aspergillus flavus* e/ou de *A. parasiticus*, duas espécies produtoras de aflatoxinas. A BGYF é emitida não pela aflatoxina mas pela acção de enzimas do ácido kójico, um metabolito geralmente co-produzido com a aflatoxina. A presença de outros organismos, sementes de erva daninha e outro material estranho pode emitir a BGYF, levando a interpretações erróneas.

Já se falou que os métodos de cromatografia líquida de alta performance/pressão ou a análise por cromatografia de camada fina dos extractos fúngicos são os métodos mais comumente usados na análise de micotoxinas. Como se viu também, a análise por HPLC é cara, lenta e requer pessoal devidamente preparado. Recentemente, foram desenvolvidos métodos de avaliação computadorizados que tornam esta avaliação menos subjectiva. É então de grande interesse desenvolver métodos menos complicados e mais fáceis de usar, que sejam relativamente rápidos e em caso de necessidade possibilitem a análise de micotoxinas no campo (*in situ*).

Novos e promissores métodos estão em desenvolvimento; por exemplo, o LC-MS/MS parece ser muito eficaz na obtenção de níveis de detecção muito baixos na cerveja; o NIR, a análise por polarização de fluorescência, os biossensores e a tecnologia do nariz electrónico estão também actualmente sob investigação (Méllothe, 2004).

O desenvolvimento dos métodos analíticos seguiu um processo no qual aqueles são seleccionados com base nas características mais desejáveis ao analista. Tipicamente, isto conduziu ao desenvolvimento de métodos exactos e sensíveis para a detecção de micotoxinas, dando ênfase a pormenores como o aumento da velocidade da análise e a diminuição dos custos dos ensaios.

3.4.3.2 Cromatografia líquida com detecção por espectrometria massa (LC-MS)

Estes métodos representam desenvolvimentos razoavelmente recentes na determinação de micotoxinas. As técnicas de LC-MS estão já a ter um largo e difundido uso na análise de micotoxinas apesar dos custos elevados e da necessidade de pessoal experiente. Numerosos métodos de LC/MS/MS para a determinação de micotoxinas foram desenvolvidos e publicados nos últimos anos, sendo aceite que nenhuma outra técnica na área analítica de micotoxinas se desenvolveu tão rapidamente nos últimos 10 anos. Contudo até ao momento apenas uns quantos métodos LC/MS/MS eram baseados em analitos estáveis isotopicamente marcados, principalmente devido à sua disponibilidade limitada e qualidade.

Apesar da sua elevada sensibilidade e selectividade, o LC/MS/MS vê a sua aplicabilidade limitada, devido às interferências induzidas pelas matrizes, à eficiência da ionização e à intensidade do sinal entre os padrões e os analitos, para além da supressão/realce dos iões devido aos componentes das matrizes, que entram no espectrómetro de massa conjuntamente com os analitos, sendo portanto, fontes potenciais de erros sistemáticos. Os padrões internos marcados com isótopos estáveis, possibilitam uma solução a estes problemas, e apenas recentemente, foram introduzidas micotoxinas marcadas (completamente) com ^{13}C , abrindo assim um amplo campo de aplicações e melhorias na análise de micotoxinas (in http://www.engormix.com/lc_ms_ms_%E2%80%93_e_articles_267_MYC.htm).

A tecnologia de LC/MS abre uma perspectiva de ensaios espectrométricos eficientes para análises laboratoriais de rotina, pois esta técnica, que em muitos casos utiliza como detectores, espectrómetros de multimassa, pode ser usada para uma vasta gama de potenciais analitos a serem medidos, sem limitações de massa molecular, uma preparação muito simples da amostra, não exigindo a derivatização química, apresentando apenas e devido à robustez da instrumentação, limitações ao nível da manutenção. Assim, o LC/MS e particularmente o LC acoplado ao MS tandem (LC/MS/MS) tornaram-se muito populares na análise de micotoxinas. Recentemente, foi descrito um método de LC/MS/MS para a determinação e validação de 39 micotoxinas em trigo e milho. Os analitos analisados foram a aflatoxina, os tricotecenos do tipo A e do tipo B e seus metabolitos, a zearalenona, as fumonisinas, as ocratoxinas, entre outros (Sulyok et al., 2006).

3.4.3.3 Espectrometria de Infravermelho Próximo (NIR)

A espectroscopia de infravermelho pode ser acoplada ao GC para dar um padrão espectral estável de modo a permitir a caracterização e a quantificação de diversas micotoxinas. Porém esta aplicação é altamente técnica e seria imprópria num cenário industrial. No entanto, o interesse em detectar contaminantes fúngicos no grão inteiro apenas com a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) continua a crescer desde o início da sua utilização a cerca de uma década atrás (Young and Games; Mossoba et al.; Greene et al. *in* <http://www.grainscanada.gc.ca/Cdngrain/fusarium/workshop/2003/3rdCWFHB-2003.pdf>).

Dowell and Maghirang conseguiram distinguir grãos individuais de milho contendo mais de 100 ppm de fumonisina daqueles que continham menos de 10 ppm. A análise individualizada do grão atrasa a rapidez da amostragem e requer tecnologia adicional e mais cara para funcionar convenientemente. Ruan et al. relataram um limite de detecção de 2 ppm em amostras a granel de cevada e uma correlação boa entre os métodos NIR e de GC/MS. Kos et al. não referiram nenhuma previsão incorrecta de DON a 2.59 ppm, mas obtiveram 20% de falsos positivos e 18% de falsos negativos a 1.17 ppm de DON em milho (*in* <http://www.grainscanada.gc.ca/Cdngrain/fusarium/workshop/2003/3rdCWFHB-2003.pdf>).

Moendo as amostras e registrando os espectros abaixo da pressão normal, Kos et al. (2003) conseguiram detectar a DON em quantidades tão baixas como 0.3 ppm. No trigo,

Pettersson and Aberg (2003) relataram um limite da detecção próximo de 0.4 ppm em amostras de sementes inteiras. Estes resultados estão acima dos propostos pelas directrizes da Holanda de 0.12 ppm para o DON no trigo inteiro. O NIR parece prever o DON tão bem ou melhor que os sistemas FDK (*Fusarium damaged kernels*) correntes, embora os testes de campo com o NIR possam não ser tão favoráveis uma vez que os factores que o NIR mede não são exclusivos à presença de DON. Este sistema pode ser uma ferramenta viável para a análise de amostras com a mesma exactidão como actualmente são conseguidas. O NIR surge igualmente como uma técnica promissora em cevada (Arganosa et al. in <http://www.grainscanada.gc.ca/Cdngrain/fusarium/workshop/2003/3rdCWFHB-2003.pdf>).

3.4.3.4 Biossensores

Os biossensores continuam a ser sujeitos a investigações e desenvolvimento, de modo a fornecer ferramentas apropriadas e de fácil uso na determinação de infecção fúngica e de toxinas. Esta tecnologia é baseada no uso de anticorpos ou, numa menor extensão, no uso de enzimas, bactérias e DNA como elementos de reconhecimento.

Outros sistemas de sensores que estão actualmente a ser investigados para a detecção de micotoxinas incluem sensores opto-químicos (sensores de fibra-óptica, sistemas de quimio-luminescência) e “narizes electrónicos” (in http://www.leatherheadfood.com/eman2/fsheet2_13.asp).

Os imunossensores podem oferecer certas vantagens sobre os ensaios tradicionais baseados no método ELISA. As vantagens incluem ensaios mais rápidos, reutilização dos sensores e a capacidade para monitorização contínua. Por estas razões, nos anos recentes, o número e tipo de imunossensores expandiram rapidamente, e começaram a aparecer equipamentos que incluem dispositivos SPR (*surface plasmon resonance*) e fluorescência.

Na bibliografia é relatado o desenvolvimento e aplicação de um biossensor para a detecção simultânea de quatro micotoxinas numa única amostra (van der Gaag et al., 2003). A extracção e a etapa de purificação da amostra requerem aproximadamente 15 minutos. Adicionalmente, a medição demora cerca de 10 minutos, incluindo a regeneração da superfície do sensor *chip*, num tempo total de aproximadamente 25 minutos.

Maragos and Thompson (1999) demonstraram que os sensores de fibra-óptica podem ser usados na detecção rápida de ambas micotoxinas, fumonisinas e aflatoxinas, em solução. O imunossensor para a fumonisina utiliza um formato competitivo e pode ser usado para detectar a FB1 em milho naturalmente contaminado e infectado. Para amostras altamente contaminadas, o extracto pode ser injectado após uma diluição simples. Para muitas amostras era necessário reduzir o conteúdo em solvente, concentrando os extractos em colunas de afinidade. Os pré-tratamentos da amostra podem ser evitados usando anticorpos de fumonisinas mais sensíveis.

As toxinas de *Fusarium* e de *Aspergillus* testadas podem ser todas detectadas em concentrações relevantes. Aplicando os dispositivos SPR comercialmente disponíveis permite o desenvolvimento de aparelhagem barata que pode ser usada no campo e/ou nos armazéns de entrada e/ou importação. Com o dispositivo SPR, a medição é feita pelo sinal gerado resultante da alteração de concentração de massa que acontece à superfície do sensor devida à ligação/união das moléculas que interagem, neste caso entre o antigene imobilizado (micotoxina) e o anticorpo específico adicionados à amostra. O dispositivo, que foi também configurado para a zearalenona, era muito sensível para a AFB1. Um instrumento usando o SPR foi também usado para detectar uma outra classe de micotoxinas, as fumonisinas (Mullett et al., 1998).

Os métodos não-invasivos ou não-destrutivos são atractivos porque evitam as etapas de preparação e/ou de extracção da amostra. Além disso, espera-se que o investimento de capital e de trabalho para a etapa da manipulação e da preparação da amostra seja baixo. No entanto, a etapa da determinação, pode envolver um investimento relativamente caro. A maioria das aplicações comerciais de métodos não-invasivos procura uma interface, com uma aproximação à das caixas negras, retirando a necessidade de operadores altamente formados e capazes. Destes métodos, emergiram três tecnologias para detectar DON/*Fusarium*: o nariz electrónico, a espectroscopia do infravermelho próximo e a análise da imagem do grão inteiro (in <http://www.graincanada.gc.ca/Cdngrain/fusarium/workshop/2003/3rdCWFHB-2003.pdf>).

3.4.3.5 Nariz Electrónico

A tecnologia do nariz electrónico imita o sistema olfactivo humano, pela amostragem do espaço de cabeça de uma amostra integral (grão inteiro) com uma variedade de sensores não-específicos e comparando então o padrão das suas respostas com os voláteis do espaço de cabeça para diferenciar as amostras. Estes sensores podem ser feitos de sílica ou polímeros orgânicos e em função do número de vias, tais como, uma variação da frequência num cristal ressonante, uma alteração na absorção óptica de um corante ou uma alteração na resistência eléctrica de um polímero. Uma aplicação em amostras de cevada contendo DON leva aproximadamente 20 minutos, incluindo uma etapa de aquecimento de 2 minutos, uma etapa de ventilação durante 30 segundos, uma etapa de detecção de 90 segundos e finalmente uma etapa de 15 minutos para regeneração do sensor entre amostras. Mais e maior pesquisa neste campo está, lentamente, a reduzir o tempo de análise, uma vez que os sensores são feitos para adsorver e dessorver os voláteis mais rapidamente. O equipamento é muito caro e exige um treino técnico moderado para operar. O nariz electrónico pode também ser usado para classificar vários factores relacionados com o odor em grãos. O limitado número de aplicações do nariz electrónico, e o factor de tempo impedem por ora a adopção desta técnica. A miniturização e os novos desenvolvimentos na síntese de polímeros podem eventualmente resolver estes problemas, mas actualmente é ainda uma tecnologia eficaz e útil, eliminando diversas etapas no processo analítico (*in* <http://www.grainscanada.gc.ca/Cdngrain/fusarium/workshop/2003/3rdCWFHB-2003.pdf>).

3.4.3.6 Análise de Imagem (Image analysis)

A análise de imagem e os avanços na tecnologia informática em meados dos anos 80 fizeram com que os investigadores começassem a propor a discriminação entre classes de trigo e variedades pela análise de imagem. [Shatadal et al.](#) desenvolveram um *software* o qual permite que sementes individuais do grão possam ser reconhecidas e analisadas dentro de uma amostra compacta de grãos. [Majumdar and Jayas](#) propuseram modelos para classificar grãos de cereal pela morfologia, cor, textura e pela combinação dos três. [Luo et al.](#) usaram a *machine vision* e a aproximação não-paramétrica para diferenciar as sementes de trigo saudáveis das danificadas com exactidão superior a 90%. [Kokko et al.](#) procederam à detecção de FDK usando a análise de imagem e redes neurais em sementes individuais. [Ruan et al.](#) relataram um coeficiente de correlação de 0.96 entre o FDK estimado e real

usando a *machine vision* e redes neurais e em amostras de sementes. Delwiche and Moon trabalham na análise de imagem para detectar impurezas nos grãos de trigo (*in* <http://www.grainscanada.gc.ca/Cdngrain/fusarium/workshop/2003/3rdCWFHB-2003.pdf>).

Wiwart et al. referem uma relação forte entre os componentes coloridos, tom, saturação e luminosidade, de sementes por espiga ou um milho de sementes, sugerindo o potencial da classificação da imagem na deterioração pelo *Fusarium* no *triticale*. A comercialização da *machine vision* está iminente através de um sistema de análise de imagem chamado *AcurumTM* (www.acurum.com) através da *DuPont Canada Inc.*, que escolhe amostras de um grande número de sementes individuais em poucos segundos. As tecnologias Hinz comercializam uma máquina de leito horizontal sob o nome de TrueGrade (www.hinztechnologies.com/truegrade.html), que está actualmente disponível para classificar lentilhas, feno e massas. Esta máquina faz varrimentos de uma camada planar de material, melhor do que em unidades individuais e existe algum interesse em expandir para o trigo. Ambas as máquinas não estão aprovadas para detectar com precisão e exactidão o FDK sob circunstâncias comerciais. Uma melhor medição dos níveis de FDK numa amostra levará a uma classificação mais precisa, mas ainda assim somente permitirá uma estimativa dos níveis de DON (*in* <http://www.grainscanada.gc.ca/Cdngrain/fusarium/workshop/2003/3rdCWFHB-2003.pdf>).

3.4.3.7 Inactivação Química

Existem numerosos estudos que avaliaram o uso de produtos químicos para a inactivação e redução do perigo de determinadas micotoxinas. A maioria dos estudos ocupa-se, no entanto, das aflatoxinas e aplicação a alimentação animal.

A *ammoniation* (tratamento com amónia) é o método químico que maior atenção recebeu na investigação científica. A avaliação extensiva deste procedimento demonstrou que é um modo eficaz e seguro para descontaminar rações contaminadas com aflatoxinas, sendo menos eficaz na descontaminação das fumonisinas. Mais de 99% efectivo, este processo foi usado selectivamente com sucesso nos Estados Unidos, França, Senegal, Sudão, Brasil, México e África do Sul, em alguns casos durante aproximadamente 20 anos (*in* <http://www.fao.org/docrep/X2100T/x2100t07.htm>).

Os dois processos de tratamento com amónia largamente usados para a descontaminação de aflatoxina no milho, amendoins, sementes de algodão e géneros alimentícios são a alta pressão/alta temperatura (HP/HT) e pressão atmosférica/temperatura ambiente, sendo o processo de HP/HT usado na operações do moagem das rações e a AP/AT essencialmente no campo.

A *nixtamalization*, o tratamento alcalino tradicional do milho usado na fabricação de tortilhas na América Latina, degrada parcialmente as aflatoxinas e fumonisinas, mas as moléculas residuais podem ser regeneradas por processos digestivos ou tornar-se mais tóxicas. A adição de agentes de oxidação, tais como o peróxido de hidrogénio, mostrou ser uma ajuda eficiente na *nixtamalization*. Estes químicos degradam as aflatoxinas e fumonisinas, reduzindo assim a toxicidade. Alguns estudos recentes mostraram que o peróxido de hidrogénio (água oxigenada) e bicarbonato de sódio são eficientes na degradação/desintoxicação simultânea de aflatoxinas e fumonisinas. Outros processos químicos promissores no controlo de aflatoxinas são o uso de cloreto de sódio durante o processamento térmico, de bissulfito de sódio a várias temperaturas e ozonização (*in* <http://www.fao.org/docrep/X2100T/x2100t07.htm>).

Algumas fases no processo industrial podem reduzir algumas micotoxinas até certo grau por intermédio da inactivação térmica, mas algumas micotoxinas são quimicamente estáveis e não serão completamente destruídas às temperaturas de processamento. O modo mais satisfatório para destruir micotoxinas que já se tenham formado ainda não foi identificado.

A irradiação pode também ser uma opção no controlo de micotoxinas. No entanto, a irradiação apenas deverá ser considerada como um método de controlo dos fungos produtores de micotoxinas em certos produtos, pois legalmente a dose máxima para a *irradiação* de produtos alimentares é de 3 Kgray e estudos indicam que para o controlo de aflatoxinas são necessária uma dose na ordem dos 500 Kgray e para a ocratoxina A de 75 Kgray.

O site http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=404001&fy=2003 apresenta uma série de projectos sobre os métodos desenvolvidos recentemente para análise de micotoxinas bem como o site <http://www.vicam.com/products/mycotoxin.html> onde são disponibilizados testes rápidos para detectar com precisão algumas toxinas fúngicas.

Os desenvolvimentos recentes nas tecnologias e equipamentos permitiram o aparecimento de outras técnicas para a detecção de micotoxinas, com particular destaque para os biossensores, especificamente, o desenvolvimento das seguintes tecnologias: *surface plasmon resonance*, sensores de fibra óptica, *lateral flow* e *dipstick devices*, polarização por fluorescência e *time-resolved fluorescence*, *microbead assays* e imunoensaios electroforéticos capilares. O desafio que se coloca as estas tecnologias emergentes é demonstrar as vantagens em relação às técnicas convencionais e já estabelecidas nos laboratórios de análise (Maragos, 2004).

Os métodos rápidos para a análise de micotoxinas têm-se tornado cada vez mais importantes e arroga-se que este tipo de métodos deve possuir algumas características basilares como sejam: devem ser fáceis de usar, ser relativamente rápidos e capazes de testar micotoxinas no campo.

3.4.3.8 Polarização de fluorescência

Com a análise por polarização de fluorescência de toxinas, um marcador consiste na toxina ligada a uma molécula fluorescente em vez de estar ligada a uma enzima como no ELISA. No lugar de medir a intensidade da fluorescência, é medida a velocidade de rotação do fluoróforo pela sua polarização. Se o fluoróforo está ligado a uma molécula grande, a velocidade de rotação é reduzida e a polarização aumentada. Consequentemente, uma competição entre o DON, por exemplo, numa amostra e o DON ligado a uma fluoresceína por um anticorpo, como o anticorpo se liga ao conjugado do fluoróforo, a rotação deste é reduzida e a polarização é aumentada. A vantagem deste método é que pode ser usado mesmo em soluções opacas, e, tal como o ELISA, não necessita de purificação da amostra. Enquanto na análise de amostras de trigo foram obtidos bons resultados, as amostras de milho não apresentaram uma tão boa correlação comparando com a análise com HPLC (Maragos et al., 2002).

Não querendo alongar em demasia este capítulo sobre as metodologias analíticas para a determinação das micotoxinas, julga-se no entanto relevante fazer referência a um artigo de revisão geral sobre a análise de micotoxinas utilizando os chamados métodos rápidos apresentando o princípio básico de cada método assim como as vantagens e limitações de cada um deles, normalmente mais onerosos e mais demorados [Zheng et al. \(2006\)](#). Os métodos enunciados são o ELISA; o imunoensaio baseado no *flow through membrane*; os ensaios fluorométricos com purificação com IAC (*immunoaffinity column*) ou com colunas SPE (*solid phase extraction*) e a polarização por fluorescência. Estes métodos encontram-se já disponíveis comercialmente e para além de fiáveis, são seguros. Esta revisão enuncia ainda outras tecnologias emergentes, com potencial de aplicação na análise de micotoxinas, como sejam, a *Evanescent wave technology*, nomeadamente o biossensor de *surface plasmon resonance* e o imunossensor de fibra óptica, os MIP's (*molecular imprinted polymers*), a tecnologia de *microarray* e a tecnologia *Luminex xMAP®*.

3.5 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE

Embora as metodologias analíticas possam consistir apenas na extracção, purificação e passos de quantificação, os resultados das análises por tais métodos devem ser similares quando estes são aplicados correctamente. Não estando a confiança dos dados quantitativos em questão, o problema a ser resolvido é a confirmação da identidade das micotoxinas. É por demais aceite que a confirmação das amostras positivas é indispensável para assegurar a qualidade da análise.

Como acima visto, as micotoxinas são detectadas e determinadas por procedimentos analíticos baseados em propriedades físicas, químicas e biológicas, como por exemplo, absorvância ultravioleta, fluorescência, solubilidade e tempos de retenção cromatográfica durante o TLC e ou cromatografia líquida. Embora estes métodos sejam úteis para a determinação da quantidade de micotoxina, eles falham na especificidade pelo que (por vezes) é necessária uma etapa de identificação/confirmação da micotoxina. Assim, para a aceitação dos resultados analíticos baseados nestas propriedades, especialmente para fins de regulamentação, a prova de identidade do composto a ser analisado é essencial.

Inúmeros testes foram concebidos para a confirmação da identidade. Estes incluem os testes baseados nos efeitos toxicológicos observados em animais; em testes químicos baseados na formação dos derivados tais como acetatos e aductos da água; e testes baseados em mudanças da cor de pontos/manchas do TLC após o contacto com reagentes de revelação, como por exemplo, o ácido sulfúrico.

Todos estes testes apresentam incertezas intrínsecas na interpretação da identidade das micotoxinas. Daí que as técnicas de confirmação da identidade mais usadas envolvam a derivatização química ou a espectrometria de massa, sendo este um dos métodos mais específicos de identificação disponível. No entanto, encontra alguma dificuldade de aplicação devido às baixas concentrações em que as micotoxinas são rotineiramente detectadas.

3.6 A METODOLOGIA ANALÍTICA POR MICOTOXINA

3.6.1 Aflatoxinas

3.6.1.1 EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO

Ali et al. (2005) apresentaram um método, que envolve a diluição dos extractos das amostras de ervas medicinais com *Tween 20-phosphate buffered saline* (1:9, v/v) e um sistema cromatográfico usando uma fase móvel isocrática composta por água-metanol-acetonitrilo (70:20:10, v/v/v), e que mostrou ser efectiva na separação das AFB₁, AFG₁ e AFG₂ das substâncias interferentes.

A extracção e purificação das amostras eram efectuadas usando um método relatado em trabalho anteriores usando IAC com algumas modificações. Os extractos das amostras foram diluídos cinco e sete vezes usando diferentes diluentes, nomeadamente PBS, água, *Tween 20-PBS* (1:9 e 2:8, v/v) e *Tween 20-água* (1:9, v/v). Os extractos diluídos cinco vezes com *Tween 20-PBS* (1:9, v/v) apresentaram melhor resultados de recuperação. No método aplicado neste estudo, a 5 g de amostra adicionou-se 1 g de cloreto de sódio, e extraiu-se com 25 ml de uma mistura metanol-água (7:3, v/v) (Ali et al., 2005).

As aflatoxinas B e G foram extraídas das amostras de cereais, ovos, frutos de casca rija (e.g.: nozes) e produtos derivados com uma mistura de metanol/água. O correspondente

extracto foi diluído com água antes de ser purificado numa coluna de imunoafinidade. A AFM1 foi extraída das amostras de leite e produtos lácteos (queijos, manteiga e produtos lácteos frescos), usando diclorometano e depois lavada com hexano. O extracto resultante foi purificado numa coluna de imunoafinidade. Para o leite, as amostras foram purificadas directamente em colunas de imunoafinidade.

Segundo [Sales and Yoshizawa \(2005\)](#) as amostras de arroz eram extraídas e purificadas de acordo com um método oficial japonês para análise de aflatoxinas em alimentos (*Japan Ministry of Health, Welfare and Development 2002*). As amostras eram derivatizadas pela adição de 100 ml de ácido trifluoroacético (TFA) (*Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan*) antes da análise por HPLC. [Li et al. \(2001\)](#) também usou um método análogo em amostras de milho positivas para aflatoxina, as quais foram extraídas com clorofórmio/água (10:1, v/v), purificadas numa coluna de florisil e determinadas quantitativamente por HPLC após derivatização com ácido trifluoroacético.

[Vega \(2005\)](#) relatou que amostras de manteiga de amendoim foram extraídas com uma solução metanol 15% cloreto de sódio (7+3) seguida por uma segunda extracção com metanol apenas. O extracto foi sujeito a uma purificação usando uma coluna de imunoafinidade *Vicam Aflatest®*. Este método de extracção e o método oficial AOAC 991.31 produziram resultados comparáveis usando amostras de manteiga de amendoim. No entanto, revelou-se mais rápido e para além disso, o consumo de solventes orgânicos foi diminuído em 85% quando comparado com o método AOAC.

A aflatoxina M1 é um componente polar fraco e é extractável com solventes tais como o metanol, a acetona, o clorofórmio ou combinações destes solventes com água. Na prática, a escolha do solvente depende dos procedimentos de purificação e de separação. Várias misturas de metanol e água, acetona e água e acetona, clorofórmio e água foram usadas para extrair a aflatoxina M1 do leite em pó (*in* [FAO – Food and Nutrition Paper 74](#)).

No primeiro método eficaz para a determinação da AFM1 no leite, foram usados como os solventes da extracção, o metanol e a água, o qual foi sendo modificado, conduzindo a um método apropriado para estudos colaborativos. O método de [Stubblefield and Shannon](#)

envolvia a extracção com acetona e água, precipitação com solução de acetato de chumbo para desproteíniaz o leite e uma etapa de desengorduramento com hexano. Um avanço mais recente na extracção quantitativa da aflatoxina M1 e da subsequente etapa de purificação é uso de cartuchos de imunoafinidade. Estas colunas são compostas por anticorpos monoclonais específicos para a aflatoxina M1, os quais são imobilizados em *Sepharose*® e são empacotados em pequenos cartuchos. O primeiro método publicado para a aflatoxina M1 com colunas de imunoafinidade é devido a [Mortimer et al.](#) (in <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm>).

O uso de *kits* de imunoafinidade para purificação de extractos de leite foi subsequentemente introduzido e a combinação da purificação por imunoafinidade e cromatografia líquida oferece o melhor modo para a purificação eficiente e determinação precisa de concentrações baixas de aflatoxina M1. Esta combinação é largamente usada em algumas partes do mundo, por exemplo, na UE, onde estão em vigor limites baixos para a aflatoxina M1 no leite, sendo o método executado com sucesso pelos laboratórios nacionais de referência para o leite e produtos derivados ([Dragacci et al., 2001](#)).

Foram desenvolvidas e estão a ser validadas alternativas mais baratas baseadas na purificação por imunoafinidade com TLC e densitometria computadorizada. Um desenvolvimento interessante é o teste de campo portátil envolvendo um ensaio imunoenzimático, baseado no fluxo através da membrana (*membrane-based flow-through enzyme immunoassay*), que pode ser executado no campo ([Sibanda et al., 1999](#)).

3.6.1.2 DERIVATIZAÇÃO

A intensidade da fluorescência das aflatoxinas pode ser melhorada por derivatização pré-coluna com ácido trifluoroacético ou por derivatização pós-coluna com iodo ou bromo ([Kok, 1994](#)). Num outro estudo, [Trucksess et al. \(2006\)](#) utilizando amostras de *ginseng* e de outras raízes (botânicas) compararam três técnicas de derivatização para melhorar a fluorescência das aflatoxinas: ácido trifluoroacético pré-coluna, bromação pós-coluna e irradiação UV pós-coluna. Vários autores referem-se a uma (ou combinação) destas técnicas de derivatização como a mais adequada na análise das várias aflatoxinas.

3.6.1.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Existem vários métodos analíticos disponíveis para a determinação de aflatoxinas, nos quais (e os mais correntemente usados) se incluem o TLC, o LC (HPLC) e os ensaios imunológicos (ELISA) (D'Ovidio et al, 2006).

O HPLC e em alguns casos, o TLC são claramente os métodos preferencialmente utilizados na análise de AF's devido à sua simplicidade e praticabilidade. Desde 1990, foi considerado como método oficial da AOAC e o escolhido para identificar e quantificar aflatoxinas em quantidades tão baixas quanto 1 ng/g. No entanto, apresenta algumas desvantagens como a baixa sensibilidade e uma precisão pobre. O método cromatográfico preferencial para detecção da aflatoxina é o HPLC-FLD, com um nível de ruído baixo e eficiente e detecção por fluorescência robusta e quantitativa. No entanto, as aflatoxinas têm uma fluorescência nativa fraca, que pode ser ampliada por derivatização pré- ou pós-coluna (Sforza et al., 2006).

No entanto, é também relatado o uso de métodos imunoquímicos, nomeadamente o método ELISA, considerados selectivos (com apreciável especificidade), sensíveis e rápidos, com recurso a reacções antigene-anticorpo. Inclusivamente, têm sido mais frequentemente usados na determinação de aflatoxinas em produtos alimentares (Leszczunskz et al., 2000).

Para a determinação das aflatoxinas B e G, existe um método que foi validado de acordo com a NF V03-110 (padrão). A análise é executada usando o HPLC com uma coluna C18 e derivatização pós-coluna com bromo. Para a aflatoxina M1, o método usado foi validado de acordo com os princípios da NF V03-110 (padrão) e segue os princípios da ISO EN 14501 (padrão). As análises são executadas usando o HPLC com uma coluna C18 com detecção fluorimétrica (Leblanc et al., 2005).

Para a determinação de aflatoxina total, em produtos alimentícios à base de milho comercializados no Brasil foram utilizadas as técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA) e cromatografia em camada fina (TLC) (Amaral et al., 2006). A recuperação média do método foi de 109.5 % para as aflatoxinas. Os limites de detecção para a AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 foram: 3.2 µg/kg, 1.4 µg/kg, 3.2 µg/kg e 0.5 µg/kg, respectivamente. Os

resultados foram semelhantes aos encontrados por vários autores. Os limites de detecção obtidos por [Milanez et al. \(2006\)](#) para o método TLC foram 2.5 µg/kg para AFB1 e AFG1 e 1,0 µg/kg para AFB2 e AFG2. [Vargas et al. \(2001\)](#), utilizando TLC com detecção por densitometria de fluorescência, obtiveram os seguintes limites de detecção e recuperação para amostras adicionadas com AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2: 0.20 µg/kg e 94%, 0.10 µg/kg e 85%, 0.19 µg/kg e 94% e 0.10 µg/kg e 97%, respectivamente. Os resultados obtidos permitem concluir que a utilização do ELISA é adequada para uma determinação rápida, simples e com baixa utilização de solventes orgânicos de aflatoxinas em amostras de milho e derivados, desde que os resultados sejam sempre confirmados por outras técnicas alternativas, de modo a evitar resultados falso-positivos e/ou falso-negativos ([Amaral et al., 2006](#)).

[Ali et al. \(2005\)](#) usaram o HPLC para determinar aflatoxinas usando colunas analíticas *Capcell Pak C18 UG120 (Shiseido Fine Chemicals, Tokyo, Japan)* e *Shim-pack CLC-ODS (Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan)*, ambas com tamanho de partícula de 5 µm, 250 · 4.6 mm. O sistema cromatográfico, escolhido para este estudo, usou uma coluna *Shim-pack CLC-ODS* e fase móvel com a razão de 70:20:10, tendo sido efectiva na separação de AFB1, AFG1 e AFG2 dos interferentes nos seus tempos de retenção. A análise com HPLC foi conduzida como descrita no método oficial japonês para a análise de aflatoxinas em alimentos (*Japan Ministry of Health, Welfare and Development 2002*). A fase móvel era constituída por acetoneitrilo:metanol:água (10:25:65) que foi desgaseificada por sonicação antes de ser utilizada. As aflatoxinas e seus derivados foram detectados nos comprimentos de onda de excitação e da emissão de 365 e de 450 nm, respectivamente ([Sales and Yoshizawa, 2005](#)).

Foi relatada a detecção por FID, o que permitiu a separação das AFB1, AFB2 e AFG1, AFG2 numa coluna de fenilmetilsilicone de 5% ([Goto et al., 1988](#)). As colunas de sílica fundida revestidas com metilsilicone foram também usadas num estudo conduzido por [Trucksess et al. \(1984\)](#).

A maioria de métodos analíticos quantitativos para a aflatoxina M1 envolve o TLC ou o HPLC. Com o desenvolvimento da cromatografia líquida nos anos 80, a maior parte dos

laboratórios abandonou o uso do TLC na análise da aflatoxina M1. Os métodos quantitativos que foram desenvolvidos e validados para a aflatoxina M1 no leite e produtos derivados foram originalmente projectados para analisar o leite em pó. Muitos destes métodos foram desenvolvidos para a análise de leite e leite em pó mas podem ser utilizados para outros produtos lácteos. O TLC com detecção por fluorescência foi usado para a separação, detecção e quantificação finais. O estudo colaborativo foi bem sucedido (Stubblefield and Shannon, 1974b) e o método tornado oficial para a aflatoxina M1 pela AOAC e do IUPAC (in <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm>).

Foram também descritos testes de rastreio (*screening*) usados na análise da aflatoxina M1 em leite e produtos derivados e que são usualmente de natureza imunoquímica e incluem ensaios imuno-radiológicos e ELISA. Os primeiros encontraram pouca aplicação na determinação e investigação rotineira de AFM1, sendo o método ELISA (um dos imunoenaios enzimáticos mais comuns) aquele que é o mais frequentemente usado. Sibanda et al. (1999) relatam o desenvolvimento de um imunoenasiao rápido e portátil para a determinação de AFM1 em leite.

A combinação da purificação por imunoafinidade e cromatografia líquida oferece o melhor modo para a purificação eficiente e determinação precisa de concentrações baixas de aflatoxina M1 e é largamente usada em algumas partes do mundo, como por exemplo na União Europeia, onde estão em vigor limites baixos para a aflatoxina M1 no leite, sendo o método executado com sucesso pelos laboratórios nacionais de referência para o leite e produtos derivados (Dragacci et al., 2001). O método pode, no entanto, ser demasiado caro para o uso rotineiro em países em vias de desenvolvimento. Uma alternativa interessante menos onerosa será um método que combine a purificação por imunoafinidade com o TLC e um densitómetro de baixo custo, computadorizado. Com os métodos de análise modernos, em amostras de leite, a AFM1 pode ser determinada em concentrações bem abaixo de 0.05 µg/kg.

Existem comercialmente disponíveis vários métodos ELISA competitivos directos para a aflatoxina M1. Uma utilização bem sucedida de um ELISA competitivo directo, em que os resultados foram confirmados por um método validado de HPLC, envolvia o ELISA na

determinação de aflatoxina M1 em leite pasteurizado, fórmulas infantis, leite em pó e iogurte (Kim et al., 2000). Estes autores concluíram que os resultados para a aflatoxina M1 obtidos com o ELISA eram similares aos obtidos por HPLC. Num estudo, no qual o ELISA e HPLC com purificação por imunoafinidade foram comparados, esta última técnica mostrou ser superior (Biancardi, 1997). Para fins reguladores, os resultados positivos com o método ELISA devem ser confirmados por um método de referência.

Como referem Lee et al. (2004), nas duas últimas décadas verificou-se um rápido desenvolvimento de métodos ELISA para a aflatoxina e seus metabolitos devido à sua adaptabilidade, sensibilidade e selectividade. Apresentam mesmo alguns exemplos, como sejam, o ELISA específico para AFB1, AFB2, AFG1, o total das aflatoxinas e cada um dos seus principais metabolitos - AFB2a, AFQ1, e AFM1.

O método ELISA mostrou-se simples, rápido e com menor uso de solventes orgânicos, porém apresentou resultados presuntivos positivos e negativos, tornando necessária a confirmação da identidade das micotoxinas pesquisadas por TLC (Amaral et al., 2006).

OUTROS MÉTODOS

A espectrometria de massa pode também ser aplicada para a detecção e identificação de aflatoxinas. Uma primeira aproximação à análise de aflatoxinas usando uma interface LC *thermospray*/MS foi introduzida por Hurst et al. Após a extracção de amostras de amendoim por um método de SPE, usaram o HPLC acoplado a um detector MS *thermospray* para a determinação das AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2.

Cappiello et al. relataram o uso de coluna capilar em fase reversa acoplada a uma interface modificada *particle beam* para a determinação de aflatoxinas em amendoins. Nos últimos anos, novas “gerações” de instrumentos MS/MS *tandem* permitiram atingir limites de detecção comparáveis aos obtidos com detectores de fluorescência, estimulando o desenvolvimento de métodos LC/MS para a confirmação de amostras já identificadas com positivas com a detecção por fluorescência. No entanto, é importante ter em mente que a vantagem da especificidade dos detectores de MS não é (frequentemente) essencial na determinação de aflatoxinas (Sforza et al., 2006).

O LC-MS tem sido uma técnica muito usada na identificação de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), pois não é necessária a derivatização, o que faz aumentar a sensibilidade e no modo *Selected Ion Monitoring* (SIM), podem ser detectados a níveis tão baixos na ordem dos picogramas. A adição de bisulfito de sódio como um agente de derivatização conduz apenas à formação de aductos dos metabolitos B1 e G1. Embora os limites de detecção do MS fossem muito aceitáveis, a quantificação era totalmente insatisfatória, devido às interferências nos cromatogramas de massa. Um bom exemplo dos problemas usualmente encontrados quando se usa o LC/MS/MS para a determinação de aflatoxinas é dado por [Vahl and Jorgensen](#). O uso de detectores MS em métodos LC confirmatórios foi também relatado por [Trucksess et al.](#) que usando um método LC/APCI-MS/MS confirmaram contaminações de aflatoxina em amostras de Incaparina, uma mistura de milho e *cottonseed flour* com adição de vitaminas, sais minerais e um preservante ([Sforza et al., 2006](#)).

Uma recente comparação directa de FLD, detecção MS e teste ELISA foi descrita por [Blesa et al.](#), que aplicou um procedimento novo de extracção [*matrix solid phase dispersion*, (MSPD)] antes da determinação por LC de aflatoxinas em amendoins. E mais recentemente ainda, [Takino et al.](#) apresentaram um método optimizado LC/APPI-MS (*single quadrupole analyzer*) para a detecção de aflatoxinas em vários alimentos (milho, amendoins, nozes, pimenta). Esta técnica parece ser menos afectada pelas interferências da matriz, quando comparada com as técnicas de ESI e APCI, resultando em sinais mais estáveis e melhores limites de detecção ([Sforza et al., 2006](#)).

[Pazzi et al. \(2005\)](#) aplicaram o HPLC-APCI-MS (APCI: ionização química à pressão atmosférica) para a determinação de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1, M2 em amostras de leite inteiro, rações de milho e em amostras contaminadas artificialmente de amendoim explorando vários modos de análise espectrométrica de massa (MS/MS, MS3 e SRM: *Selected Reaction Monitoring*), a fim de optimizar selectividade e sensibilidade. Concluíram que o uso de HPLC-MS-APCI garante uma técnica eficaz para a determinação das aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1, M2 nos vários extractos de produtos alimentares e que a alta especificidade do MS permite determinar as seis aflatoxinas, reduzindo a purificação da amostra ao mínimo.

Existem muitos métodos de análise disponíveis para a determinação da AFM1 em leite e produtos derivados, tanto para avaliações *screening* como quantitativas. Os limites de detecção decresceram ao longo dos anos, enquanto a precisão dos métodos melhorou. Com métodos de análise modernos, a AFM1 pode ser determinada em concentrações bem abaixo de 0.05 µg/kg de leite. Foram desenvolvidas e estão a ser validadas alternativas mais baratas baseadas na purificação por imunoafinidade com TLC e densitometria computadorizada. Um desenvolvimento interessante é o teste de campo portátil envolvendo um imunoensaio enzimático, baseado no fluxo através da membrana (*membrane-based flow-through enzyme immunoassay*), que pode ser executado no campo (Sibanda et al., 1999).

3.6.1.4 CONFIRMAÇÃO

Ali et al. (2005) efectuou uma confirmação qualitativa dos resultados obtidos, comparando os cromatogramas de HPLC do “complexo” TFA-extracto de amostra derivatizado e não derivatizado para as intensidades de fluorescência das AFB1 e AFG1 tendo realizado para cada amostra e para a confirmação quantitativa, um sistema HPLC similar (derivatização pós-coluna) equipado com um reactor fotoquímico (*Aura Industries, Inc.*, New York, USA). A identidade das toxinas foi confirmada por reacções de derivatização e avaliada com os padrões por cromatografia de camada fina. Madhyastha and Bhat desenvolveram um método em minicoluna, usando H₂SO₄ 20%, HCl 20% ou TFA em HNO₃ 20%. Todos estes ácidos mudaram a fluorescência de azul para amarelo, com o TFA em HNO₃ 20% a apresentar o limite de detection mais baixo. O método AOAC para a confirmação da aflatoxina é baseado na reacção do TFA com as aflatoxinas B1, G1 ou M1. Trucksess et al. publicaram um método rápido de TLC usando uma coluna de silicagel na purificação e confirmação por GC-MS (*in* <http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E0m.htm>).

3.6.2 Fumonisin

3.6.2.1 EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO

A capacidade de extracção das fumonisin a partir de produtos à base de milho pode variar significativamente e ser influenciada por factores como a composição química da matriz, o tipo de solvente de extracção e respectivo volume, o pH do solvente de extracção e outras condições experimentais (Voss et al. citados em Lino et al., 2006b).

Para a avaliação actual e nos laboratórios que forneceram dados de ocorrência natural das fumonisin no milho e alimentos derivados do milho, a técnica predominantemente usada foi a cromatografia líquida, juntamente com a extracção com solvente, extracção em fase sólida (para a purificação das amostras) e quantificação pela formação de derivados fluorescentes de *o*-ftaldialdeído. Os limites da detecção eram geralmente inferiores a 50 mg/kg e a recuperação analítica maior do que 70% (in WHO Technical Report Series 906).

Por se tratarem de moléculas fortemente polares, as fumonisin são solúveis em água e solventes polares e insolúveis em solventes orgânicos. A sua extracção a partir de matrizes alimentares é conseguida usando água, acetonitrilo e metanol. Verificam-se, no entanto, variações no que diz respeito à mistura dos solventes, bem como no que se refere às proporções relativas usadas e na quantidade de amostra usada no processo extractivo, variando entre 5 g e 50 g (Kedera et al., Lombaert et al. citados em Lino et al., 2006b).

De entre os processos de extracção aplicados à determinação de fumonisin observa-se que a mistura metanol/água é a mais amplamente utilizada. As proporções empregues são variáveis; existindo referências a proporções de 4:1, de 3:1 como é o caso de Gelderblom et al. ao extraírem pela primeira vez FB1 e FB2 de culturas de milho contaminadas com *Fusarium moniliforme* MRC 826 e de Shephard et al. quando desenvolveram o primeiro método de HPLC para determinação simultânea de FB1 e FB2 em milho naturalmente contaminado e em rações; e outros autores, como por ex. Sydenham et al., Piñeiro et al., Castellá et al., Picco et al.; Bankole and Mabekoje, que também adoptaram esta proporção, ou ainda a proporção de 70:30 (Lino et al., 2006b).

A extracção em milho e derivados; cereais e outros alimentos é feita usando MeOH+H₂O (70:30). Em ração, milho e derivados é conseguida com MeOH+H₂O (3:1) seguida de purificação com SAX e ou resinas XAD. Em amostras de cereais infantis, verifica-se a utilização de MeOH+ACN+H₂O (1:1:2) seguida de purificação em colunas C18. No caso de amostras de tortilha, há relatos do processo de extracção com ACN+NaH₂PO₄ a pH 3,0, ACN+NaH₂PO₄ (1:1) a pH 3,0 e EDTA+MeOH (1:1) (Lino et al., 2006b).

Para a extracção de fumonisinas de *cornflakes*, foram avaliados o MeOH/H₂O (ajustado a pH 4 com HCl; 70:30, v/v), ACN/MeOH/H₂O (25:25:50, v/v/v) e ACN/MeOH/H₂O acidificado (25:25:50, v/v/v; pH 4). A preferência foi para o MeOH/H₂O acidificado (70:30, v/v). A purificação foi efectuada usando colunas de imunoafinidade (*FumoniTest*, VICAM) (Paepens et al., 2005).

Cirillo et al. usaram apenas metanol na extracção de FB1 e FB2 de cereais e de outros alimentos. A mistura acetonitrilo/água (1:1) é também muito usada. Em 1994, Chu and Li utilizaram este solvente de extracção quando associaram a ocorrência de FB1 e de outras micotoxinas, presentes em milho com bolor, com a alta incidência de EC em algumas regiões da China. Plattner, Voss et al. e Bittencourt et al. citados em Lino et al. (2006b), também adoptaram a referida mistura. A eficácia de extracção da mistura acetonitrilo/água é superior quando comparada com metanol/água, principalmente nos alimentos à base de milho, devido à absorção, ligação ou às reacções químicas dos ingredientes dos referidos alimentos com as fumonisinas. Outra possibilidade consiste na utilização da mistura metanol/acetonitrilo/água (25:25:50).

Lino et al. (2006b) apresentaram um método optimizado que revela bons resultados em termos de exactidão, repetibilidade, precisão e sensibilidade intermediária e que se revelou consistente na análise e determinação de fumonisinas em milho e produtos derivados. Este método envolve uma extracção com metanol/água (80:20, v/v), diluição com PBS, purificação com uma coluna de imunoafinidade e derivatização com naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA).

Um método otimizado por [Hinojo et al. \(2006\)](#) para a análise de FB1 e FB2 em arroz envolve a extração com acetone/água (50:50, v/v) e purificação com cartucho de SPE C18, que é vantajoso em termos de baixo custo, tempo de análise e consumo de solvente. O limite de detecção foi de 0.010 mg.kg⁻¹ para ambas as toxinas. Na escala de contaminação de 10-500 mg.kg⁻¹, as taxas de recuperação de FB1 e FB2 no arroz variaram de 94.6% a 103.6% e de 96.3% a 101.9%, respectivamente.

A purificação permite remover impurezas da matriz e concentrar as fumonisinas. Esta etapa pode ser conseguida recorrendo à extração em fase sólida (SPE) em fase reversa, usando sílica octadecilgada (C18) ou troca aniónica (SAX). Podem também ser usadas as colunas de imunoafinidade (IAC) e resinas Amberlite XAD. A selecção do procedimento de purificação dos extractos das amostras depende do limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) que se pretende atingir. As colunas SAX permitem melhores resultados que as C18 para as fumonisinas intactas, no entanto, requerem uma monitorização do pH do extracto da amostra - acima de 5,8 para uma retenção adequada na coluna SAX - e um controlo cuidadoso do fluxo de eluição - que não pode ser superior a 1 mL/min para ser possível a obtenção de recuperações reprodutíveis ([Lino et al., 2006b](#)).

Relativamente à purificação com colunas C18, têm-se observado variações importantes na percentagem de recuperação obtida. Pensa-se que tal facto se deve à interacção das fumonisinas com os locais activos do adsorvente. As colunas IAC possuem anticorpos que reagem especificamente com as fumonisinas, permitindo uma purificação mais selectiva. Deve-se, contudo, assegurar que todos os compostos que se pretendem quantificar reagem com os anticorpos e são retidos na coluna. Actualmente são amplamente usadas ([Lino et al., 2006b](#)).

[Duncan et al. \(1998\)](#) descrevem métodos otimizados para a purificação por imunoafinidade e detecção por HPLC ou método fluorométrico directo para determinação das fumonisinas. Estes métodos estão disponíveis na forma de *kits*, como por exemplo o *FumoniTest*-HPLC ou o *FumoniTest*-fluorometer (Vicam, Watertown, MA, EUA). O uso de colunas de imunoafinidade para a análise de fumonisinas em milho e subsequente detecção por métodos de HPLC (*FumoniTest*-HPLC) ou de fluorómetro (*FumoniTest*-

fluorometer) foram inicialmente descritos por Hansen et al. O desempenho da coluna de *FumoniTest* foi avaliado detalhadamente por Ware et al. e usado para a determinação de fumonisinas em refeições enlatadas e congeladas de milho doce, refeições e rações de glúten de milho, no leite e na cerveja. Verificam-se ganhos significativos no desempenho se a detecção dos derivados fluorescentes da fumonisina é realizada por HPLC ou pelo fluorómetro. O *FumoniTest*-HPLC oferece a capacidade de discriminar e quantificar de uma forma independente as diferentes fumonisinas, enquanto que o *FumoniTest-fluorometer* descreve as fumonisinas totais.

3.6.2.2 DERIVATIZAÇÃO

Como as fumonisinas não apresentam fluorescência nativa para se conseguir uma detecção por fluorescência com sensibilidade a baixos níveis, necessários para a análise de alimentos contaminados, nem possuem cromóforos para exibir a radiação e, portanto, não absorvem a luz UV, nem no visível, é imprescindível a derivatização prévia dos extractos das amostras para obter derivados fluorescentes (Lino et al., 2006b).

Para tal, foram usados diferentes reagentes tais como fluorescamina, o-ftaldialdeído (OPA), 4-fluoro-7-nitrobenzofurazano (NBD-F), 9-fluorenilmetil cloroformato ou naftaleno 2,3-dicarboaldeído (Hinojo et al., 2006). A reacção de derivatização dá-se entre o reagente derivatizante e a amina primária das fumonisinas (Lino et al., 2006b).

A maioria dos investigadores referiu o uso de pré-coluna de derivatização com o-ftaldialdeído/mercaptoetanol (OPA), apesar da sua estabilidade limitada. Foram propostos como uma alternativa viável, o naftaleno-2,3-dicarboxaldeído/cianido de potássio (NDA), embora a manipulação seja mais trabalhosa e requeira precauções adicionais de segurança. Num estudo colaborativo internacional foram relatados limites de detecção com a utilização do OPA na ordem dos 0.05 µg FB1/g e 0.1 µg FB2/g (in <http://www.ifa-tulln.ac.at/download/030827095148.pdf>).

Shephard et al. utilizaram orto-ftaldeído (OPA), na determinação quantitativa de FB1 e FB2 em amostras de milho naturalmente contaminado. O OPA é o reagente mais usado na derivatização das fumonisinas, entrando sempre na sua preparação o 2-mercaptoetanol

(MCE), usado como agente redutor. Williams et al. concluíram que a instabilidade do complexo OPA-FB1, OPA-HFB1 ou de qualquer outra fumonisin poderá ser devida à ausência do grupo hidroxilo no carbono 1, que eventualmente estabilizará a reação entre o MCE e a OPA no derivado fluorescente (Lino et al., 2006b).

A tentativa de derivatização com fluorescamina (FLA) não produziu resultados satisfatórios, uma vez que se obtiveram dois picos cromatográficos, devido à formação de dois produtos de reação (Lino et al., 2006b). O naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (NDA) usado com cianeto de potássio forma um derivado fluorescente mais intenso e estável durante 24 h. Este reagente de derivatização foi utilizado por diversos investigadores (Lino et al., 2006b). Em 1994, Chu e Li compararam as percentagens de recuperação ao utilizar OPA e NDA na derivatização de amostras de milho com bolor em regiões da China com alta incidência de cancro esofágico. Concluíram que com OPA se obtêm percentagens superiores para níveis de toxinas mais elevados e que com NDA se obtêm valores superiores para níveis de toxinas mais baixos (Lino et al., 2006b).

Outro reagente de derivatização, que também apresenta uma estabilidade limitada, é o 4-fluoro-7-nitrobenzofurazano (NBD-F). Scott e Lawrence utilizaram na derivatização de fumonisin, presentes na cerveja, OPA/MCE, NBD-F e NDA/KCN, tendo concluído que OPA/MCE é o melhor reagente de derivatização na análise daquela matriz. O 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato é outro reagente usado na derivatização de fumonisin. O sucesso da utilização deste reagente depende da acidez da fase móvel, devendo ser o metanol o solvente de eleição. Neste caso, os derivados são estáveis, pelo menos durante 48h, permitindo uma boa resposta a nível de fluorescência (Lino et al., 2006b).

3.6.2.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

A prevalência difundida das fumonisin e a toxicidade associada com a sua ingestão conduziram ao desenvolvimento de métodos analíticos para determinar a quantidade de fumonisin presente nos alimentos. As fumonisin foram determinadas por diferentes métodos analíticos tais como TLC, GC, GC capilar, GC-MS, HPLC, HPLC acoplado com

coluna de imunoafinidade e métodos imunoquímicos, como por exemplo o ELISA (Duncan et al., 1998).

Embora alguns métodos GC/MS tivessem sido relatados há diversos anos, numa revisão recente a respeito da determinação das fumonisinas usando métodos cromatográficos (Shephard), nenhum método de GC/MS inovador foi desenvolvido, enquanto que vários métodos LC/MS foram propostos. De entre os vários métodos, os mais utilizados são a LC com detecção por fluorescência e com derivatização em pré-coluna com *o*-ftaldialdeído (OPA) e LC/MS. Este proporciona análises quantitativas bem como a confirmação da identidade das fumonisinas sem necessidade de derivatização (Sforza et al., 2006).

Shephard et al. desenvolveram o primeiro método quantitativo e sensível com HPLC para determinação simultânea de FB1 e FB2 em milho naturalmente contaminado e em rações tendo-o publicado em Junho 1990 (Marasas, 2001). Este método foi adoptado pela *AOAC International* em 1996 e é aceite que a técnica de HPLC oferece os melhores resultados usando a detecção por fluorescência após a purificação com colunas de imunoafinidade.

Foram também desenvolvidos métodos ELISA pois fornecem uma boa sensibilidade com um limite de uma detecção de 5-10 ng/g. No entanto, podem conduzir tanto à sobre como à sub-estimação da fumonisina no alimento, devido a combinações de diversos factores. Já o LC/MS proporciona análises quantitativas bem como a confirmação da identidade das fumonisinas sem necessidade de derivatização (Sforza et al., 2006). No entanto, a maioria destas técnicas não vão de encontro com as exigências actuais pois são demoradas, requerem instrumentação extremamente cara, revelam alguma falta de sensibilidade ou não são adequadas à rapidez inerente ao rastreio.

Com a disponibilidade de sistemas de cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa (LC-MS), um novo e potente método foi estabelecido para identificação e quantificação com o qual se pode conseguir uma alta sensibilidade, embora as desvantagens incluam altos custos de manipulação e de manutenção. Os limites de quantificação relatados situam-se tão baixo quanto 0.001 µg/g (*in* http://www.lfra.co.uk/eman2/fsheet2_4.asp).

Num método otimizado apresentado por Lino et al. (2006b), a separação e identificação foi levada a cabo usando HPLC com detecção por fluorescência. O limite de detecção foi de 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para a FB1 e 15 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para a FB2. Os níveis de recuperação de FB1 e FB2 variaram de 79% a 99.6% para milho “reforçado” com 150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente.

Para as fumonisin existe um método GC/MS que é baseado na hidrólise da cadeia lateral esterificada e na derivatização da cadeia principal da fumonisin com trimetilsilil ou trifluoroacetato. Embora sensível e selectivo, o método envolve aparelhagem cara e um pré-tratamento hidrolítico (in http://www.leatherheadfood.com/eman2/fsheet2_12.asp).

A ionização por *electrospray* e FAB têm sido usadas para a determinação da pureza, quantificação, confirmação e detecção dos isómeros estruturais de fumonisin B1 parcialmente hidrolisada.

O HPLC é a técnica analítica de separação mais usada. A razão desta popularidade, além de residir na sua elevada sensibilidade, na sua capacidade para efectuar determinações precisas e de separar espécies não voláteis, deve-se sobretudo ao facto de possuir uma grande aplicabilidade a substâncias com interesse primordial para a indústria e na investigação científica.

Foram desenvolvidos dois métodos analíticos validados baseados em cromatografia líquida para fumonisin. O primeiro método, que usa extracção solvente com forte permuta aniónica para purificação de amostras, foi validado para fumonisin B1, B2 e B3 em milho. Ainda que este método seja usado para determinar concentrações de fumonisin em alimentos derivados de milho, a recuperação de certas matrizes de alimentos pode ser problemática. Um segundo método com maior eficiência de extracção e usando colunas de imunoafinidade para purificação da amostra foi validado para as fumonisin B1 e B2 em milho e flocos de milho (in http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary_56.pdf). A derivatização é feita com orto-ftalaldeído (OPA) e 2-mercaptoetanol (ME) seguida pela separação por HPLC e pela quantificação do derivado fluorescente OPA-FB1. O método do HPLC para o

derivado OPA-FB1 é aceite como um método oficial para a análise em milho pela *AOAC International*.

As fumonisinas são moléculas polares, solúveis em água e em solventes polares. Assim, devido ao seu carácter polar, são ideais para detecção e quantificação por HPLC em fase reversa (RP-HPLC) Lino et al. (2006b), sendo esta a técnica mais extensa e geralmente usada na análise/determinação de fumonisinas, tendo mesmo sido adoptado como Método Oficial da AOAC (995.15) para a determinação de FB1, FB2 e FB3 em milho. A maioria dos investigadores refere-se ao uso da derivatização pré-coluna com o-ftaldialdeído/mercaptoetanol (OPA), apesar da sua limitada estabilidade (*in* <http://www.micotoxinas.com.br/fumofacts.htm>).

No que concerne às colunas analíticas, a maioria dos procedimentos para HPLC utiliza as de fase reversa C18, para separar as fumonisinas. Em relação à escolha das dimensões da coluna observa-se igualmente uma grande disparidade. O comprimento da coluna oscila entre 100 e 300 mm, passando por 125, 150 e 250 mm. O diâmetro interno (d.i.) da coluna é, na maioria dos casos, de 4,6 mm. Alguns autores adoptam colunas com 3,2, 3,9 e 4 mm. No que respeita ao tamanho da partícula da fase estacionária, observa-se também alguma variabilidade. A escolha recai preferencialmente para colunas com 5 µm de tamanho da partícula. Contudo, alguns optam pelos tamanhos 10, 7, 4, 3 ou 2.5 µm (Lino et al., 2006b).

Dois tipos de eluição são usados, isocrática e gradiente. Uma vez que na maioria dos procedimentos se utiliza cromatografia de fase reversa para separar as fumonisinas, a fase estacionária é apolar e a fase móvel usada é polar. Assim, em ambas as eluições os solventes mais utilizados são metanol, acetonitrilo, água, ácido acético e dihidrogenofosfato de sódio. Verificam-se variações nas misturas utilizadas no que se refere às proporções dos diferentes solventes. O pH das soluções, nalguns casos, é ajustado com ácido ortofosfórico a 3,3 ou 3,35 (Lino et al., 2006b).

Os fluxos adoptados variam entre 0.5 e 2 mL/min. E também de procedimento para procedimento. Porém o fluxo mais utilizado é de 1 mL/min. Como as fumonisinas apresentam um comportamento iónico em solução, as separações em colunas de fase

reversa são baseadas numa mistura de mecanismos de fase reversa e de troca iónica. Para se conseguirem melhores resultados a fase móvel deve ser acídica, o que se consegue através da adição de ácido acético ou fórmico à fase móvel ou pelo uso de um tampão volátil como o acetato de amónio ou o formato de amónio (Lino et al., 2006b).

A cromatografia líquida com detecção de fluorescência é amplamente usada na análise de fumonisinas em alimentos para consumo humano e animal. Numerosos investigadores recorrem ao detector de fluorescência, enquanto outros usam o espectrofluorímetro. Todavia, a determinação de fumonisinas por HPLC não dispensa a utilização de reagentes de derivatização, uma vez que, como referenciado anteriormente, se trata de moléculas sem fluorescência nativa (Lino et al., 2006b).

No entanto, a derivatização pode introduzir variabilidade nos resultados, implicar perdas de amostra e também aumentar o tempo do procedimento analítico. Por outro lado, como a derivatização das fumonisinas ocorre no grupo amina, este método não permite a detecção das amidas da série P. Os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e de emissão (λ_{emi}) usados variam de acordo com o reagente de derivatização empregue. Sendo o reagente derivatizante mais aplicado o OPA, os comprimentos de onda mais comuns são 335 nm para a excitação e 440 nm para a emissão (Lino et al., 2006b).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) permite a análise directa e a confirmação das fumonisinas (Lino et al., 2006b). Paepens et al. (2005) descrevem um método de cromatografia líquida/espectrometria de massa em tandem (LC/MS/MS) para a determinação das fumonisinas B1 (FB1), B2 (FB2) e B3 (FB3) em *cornflakes*.

Existem vários métodos para a sua determinação por MS, baseados em diferentes tipos de interfaces: “*fast atom bombardment*” (FAB), “*ion spray*” (IS), “*thermospray*” (TS), “*liquid secondary ion*” (LSI), “*electrospray*” (ESI), “*atmospheric pressure chemical ionization*” (APCI) e “*tandem mass-spectrometry*” (MS-MS) (Lino et al., 2006b).

A LC-IS-MS e a LC-ES-MS são métodos aplicados à análise de fumonisinas em culturas de fungos e em amostras naturalmente contaminadas. Segundo Plattner, a HPLC-ESI-MS é uma técnica ideal para detectar e quantificar fumonisinas sendo utilizada por diferentes autores na quantificação destas micotoxinas. Estas moléculas tendem a ser iónicas e produzem sinais abundantes tanto no modo iónico positivo como no negativo (Lino et al., 2006b).

Ao comparar a interface TS com a interface ESI, conclui-se que a última permite quantificar fumonisinas na ordem dos nanogramas, providenciando um sinal forte para a molécula iónica e uma pequena fragmentação. Ao contrário, a TS-MS conduz a múltiplos fragmentos iónicos e não apresenta sensibilidade a níveis inferiores ao micrograma. Contudo, recentemente foi descrito um método para determinação da fumonisinas no milho, por LC-TS-MS, no modo do ião negativo, apresentando um LOD da ordem dos 2 ng. Outros autores aplicaram a interface “*particle beam*” (PB), para confirmação das fumonisinas. A vantagem que esta técnica apresenta é a capacidade de proporcionar espectros de electrões e de ionização química, os quais permitem obter uma maior informação estrutural relativamente às técnicas de ionização à pressão atmosférica, tais como “*electrospray*” (Lino et al., 2006b).

O TLC é a técnica mais simples, mas tal como todos os outros métodos, a extracção e a purificação da amostra são uma contribuição importante para a exactidão e precisão dos dados obtidos. A derivatização é necessária antes que a detecção por fluorescência possa ser executada, porque as fumonisinas não contêm um cromóforo para exibir a radiação (*in* <http://www.ifa-tulln.ac.at/download/030827095148.pdf>).

O primeiro método que aplicou o TLC para determinação de fumonisinas foi desenvolvido durante o isolamento destas micotoxinas a partir de culturas de *Fusarium moniliforme* MRC 826 em milho, com o objectivo de monitorizar os eluídos das colunas. O método envolvia TLC em fase reversa em placas com sílica C18 modificada, usando como solvente MeOH/H₂O (3:1) e também TLC em fase normal em placas de sílica, usando como solvente uma mistura de clorofórmio-metanol-água-ácido acético. Finalmente, as

fumonisin eram visualizadas através da pulverização com soluções de ninhidrina ou p -anisaldeído (Gelderblom et al. citados em Lino et al., 2006b).

A utilização de fluorescamina como reagente revelador para visualizar as fumonisin com luz UV melhorou a sensibilidade, obtendo um LOD de 0,1 $\mu\text{g/g}$, e a selectividade do método, possibilitando a sua utilização na análise de milho naturalmente contaminado (Duncan et al. citados em Lino et al, 2006b).

Embora estejam disponíveis métodos para detecção inequívoca baseados em cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa, o seu alto custo proíbe o seu uso de rotina. Foram também desenvolvidos testes de triagem rápidos baseados em TLC e ELISA para as fumonisin da série B. Existe também um método oficial de ELISA para as fumonisin totais. Ambos os métodos foram adoptados pela AOAC (995.15 e 2001.04).

Para as fumonisin existe um método de GC/MS que é baseado na hidrólise da cadeia lateral esterificada e na derivatização da cadeia principal da fumonisin com trimetilsilil ou trifluoroacetato. (in http://www.leatherheadfood.com/eman2/fsheet2_12.asp). Foram também desenvolvidos métodos de GC para determinar aminopoliol depois de uma etapa de purificação numa coluna XAD-2. O aminopentol (da FB₁) e aminotetrol (da FB₂) reagem com o trimetilsilil (TMS) ou trifluoroacetato (TFA) e são detectados pela ionização de chama ou espectroscopia de massa (in http://www.lfra.co.uk/eman2/fsheet2_4.asp).

O desenvolvimento inicial de metodologias analíticas aplicadas à análise de fumonisin recorreu a técnicas de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID). Os procedimentos que utilizam GC têm a vantagem de se poderem combinar com MS para confirmação de resultados. Os avanços verificados nos métodos de LC produziram uma mudança nos métodos de GC, uma vez que embora sensível e selectivo, a metodologia GC envolve instrumentação dispendiosa e equipamento mais sofisticado, requerem etapas múltiplas de manipulação da amostra, a necessidade de um pré-tratamento hidrolítico, para além de ser mais demorada e não apresentar a sensibilidade necessária pelo que não é apropriada nem prática para se efectuar a análise de um grande número de amostras.

OUTROS MÉTODOS

IMUNOLÓGICOS

As fumonisinas, como anteriormente foi referido, são detectáveis por TLC, HPLC-FD, GC-FID, GC-MS e LC-MS. No entanto, ocorrem, por vezes, problemas quando, dada a sua complexidade, se analisam matrizes alimentares e tecidos. As interferências encontradas podem ultrapassar-se recorrendo a métodos de purificação. Contudo, o resultado final implica um procedimento mais moroso e dispendioso que pode, ocasionalmente, limitar o número de amostras a analisar diariamente (Lino et al., 2006b).

Para obviar este problema, a indústria alimentar usa ensaios imunológicos em virtude da sua relativa simplicidade, boa reprodutibilidade, e elevada sensibilidade, devido à especificidade das reacções antigénio-anticorpo, associada a custos menos onerosos e ao uso de equipamentos não sofisticados, como o método ELISA, para fazer o “screening” de micotoxinas. Este procedimento apresenta, contudo, a desvantagem de não distinguir e quantificar resíduos múltiplos, sendo necessário muitas análises individuais para determinar diferentes micotoxinas. Os ensaios imunoquímicos mostram-se ferramentas úteis e complementares dos métodos físico-químicos, para analisar micotoxinas em alimentos. Para tal, têm sido produzidos anticorpos mono e policlonais para reagir com as fumonisinas (Schneider et al. citados em Lino et al., 2006b).

ELECTROFORÉTICOS

Embora pouco difundida, pode-se recorrer à electroforese capilar de zona (CZE) para determinação de fumonisinas. A natureza aniónica das fumonisinas poderá implicar a migração electroforética através do ânodo. No entanto, com capilares de sílica fundida, o fluxo electro-osmótico do tampão através do cátodo é suficiente para transportar as fumonisinas na reacção (Maragos citado em Lino et al., 2006b).

A primeira aplicação da CZE na análise de fumonisinas foi feita por Maragos, em 1995. Pelo facto de possuírem dois grupos de ácidos tricarbóxicos que podem adquirir carga negativa, as fumonisinas têm potencial para a separação através desta técnica e detecção por fluorescência induzida por laser (CZE-LIF). Este autor defendeu também que a sensibilidade do método é mais elevada que a conseguida com HPLC (LOD para a FB1 de

0,025 pg com a CZE e 0,8 ng com HPLC). Advogou ainda que a CZE permite a utilização de um volume mais pequeno de amostra e produz volumes de solventes perigosos consideravelmente inferiores. Um dos grandes inconvenientes desta técnica reside no facto de que qualquer ligeira alteração na composição do tampão tem efeitos nefastos na separação e migração das fumonisinas (Lino et al., 2006b).

3.6.2.4 CONFIRMAÇÃO

A confirmação das amostras positivas é essencial para assegurar a qualidade da análise. Em 1991, Thiel et al. confirmaram a produção de FB1 e FB2 por culturas de diferentes espécies de *Fusarium* em milho, utilizando HPLC-FD com derivatização por OPA e GC-MS com derivatização por trifluoroacetilimidazole. Ross et al. e Shephard et al. confirmaram a presença de fumonisinas em rações associadas a problemas animais e em milho, usando TLC e GC-MS. A GC-MS foi também a técnica escolhida por Plattner et al. para confirmar a presença de fumonisinas em culturas de *Fusarium moniliforme*. Pittet et al. procederam à confirmação de FB1 em produtos à base de milho do mercado suíço aplicando uma técnica de HPTLC. O LC-MS com ionização “*electrospray*” é, hoje em dia, a técnica mais usada na confirmação de amostras positivas (Lino et al., 2006b).

3.6.3 Ocratoxina A

A metodologia analítica para a OTA inclui usualmente as etapas de extracção, purificação, separação, detecção e quantificação. Em 2002 foi adoptado no seio da União Europeia um regulamento para cereais (5 ppb) e malte (3 ppb). Foi também publicada uma Directiva relativa aos métodos de amostragem e métodos de análise da ocratoxina A nos géneros alimentícios.

3.6.3.1 EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO

Diferentes metodologias analíticas foram propostas para o rastreio da OTA, principalmente envolvendo etapas de extracção líquido-líquido ou de imunoafinidade (Ratola et al., 2006). As ocratoxinas são usualmente extraídas com solventes orgânicos acidificados (e.g. clorofórmio acidificado), uma vez que se apresentam na forma dissociada quando em condições neutras ou alcalinas (Varga and Kozakiewicz, 2006).

A extracção da ocratoxina A é usualmente conseguida com uma mistura de água e solventes orgânicos, dependendo do tipo da matriz. Para a determinação da OTA em cevada utiliza-se uma mistura de CHCl_3 e H_3PO_4 ; a extracção a partir da cevada foi levada a cabo com acetonitrilo/água e o extracto foi diluído com solução salina de fosfato tamponada (PBS) antes da purificação com colunas de imunoafinidade (*in* http://www.lfra.co.uk/eman2/fsheet2_1.asp).

Um estudo idóneo para a determinação da OTA em amostras de café torrado utiliza principalmente uma mistura de metanol com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 3% (50:50) para a extracção. Para o café verde, apenas é usado o CHCl_3 . Para a determinação em trigo, é usada uma variedade de solventes de extracção, incluindo misturas de tolueno/ HCl/MgCl_2 , diclorometano/ H_3PO_4 e CHCl_3 /etanol/ácido acético.

Zimmerli et al. referiram um método para a determinação da OTA em vinho tinto utilizando o clorofórmio para a extracção. Com a preocupação e necessidade de troca para solventes não-clorados, por causa dos perigos ambientais envolvidos, Burdaspal et al. propôs o éter de metil tetra-butil como um solvente de extracção da OTA em comida para bebés. Outras misturas de solventes não-cloradas usadas no trigo incluem, metanol/água e acetonitrilo/água (*in* <http://www.micotoxinas.com.br/ocrafacts.htm>).

Em amostras de vinho, os métodos de análise de OTA são descritos com procedimentos de extracção usando tolueno, clorofórmio ou solução de hidrogenocarbonato e PEG (Serra et al., 2003).

Zimmerli and Dick usaram a extracção com clorofórmio após adição de NaCl e acidificação seguida da purificação numa coluna de imunoafinidade (IAC). A adição de NaHCO_3 e polietileno de glicol de (PEG) 8000 à amostra seguida de purificação com IAC é relatado por Zöllner et al. que usaram a extracção em fase sólida (SPE) com cartuchos C18 previamente activados antes da separação por LC-MS-MS. Jorner et al. usaram uma modificação ligeira deste procedimento para a análise de OTA em vinho mas foi aplicada a LC-FLD. Em amostras de cerveja, a extracção foi feita usando NaHCO_3 e NaCl , após o degaseificação das amostras, seguida de purificação com IAC. Num ensaio colaborativo

usando amostras de vinho tinto e branco e cerveja, foi usada uma técnica envolvendo a diluição com PEG 8000-NaHCO₃, purificação com IAC e análise por LC-FLD, tendo depois sido promovida como *official first action* pelo AOAC (Saez et al., 2004).

Saez et al. (2004) desenvolveram um método baseado da extracção com polietileno de glicol que é relativamente simples, rápido e não requer o uso de solventes orgânicos, enquanto que González-Peñas et al. (2004) desenvolveram um método de microextracção que foi sugerido como sendo uma alternativa barata às colunas de imunoafinidade. De entre os aperfeiçoamentos recentes ao nível das técnicas analíticas, a aplicação de um método SPE *molecularly imprinted* é um caso notável (Varga and Kozakiewicz, 2006). Uma etapa apropriada da extracção da amostra usa o clorofórmio misturado com o ácido ortofosfórico ou com metanol. Para outros alimentos, foi testada a mistura acetonitrilo-água para a cevada, para outros cereais ou para grãos de trigo, em proporções diferentes.

Durante os últimos anos, o uso de colunas de imunoafinidade baseadas no anticorpo, durante a etapa de purificação, fez com que a análise da OTA fosse aperfeiçoada. Foram desenvolvidos e validados, dois métodos baseados na purificação por imunoafinidade para a determinação da OTA na cevada e no café torrado, em estudos colaborativos sob os auspícios do Comissão Europeia, *Standard and Measurement Testing programme* (Entwisle et al., 2000, 2001). No estudo colaborativo foram usadas amostras contaminadas artificialmente e naturalmente contaminadas que continham 1.2–3.7 µg/kg de OTA. Estes dois métodos foram aceites pelo AOAC internacional como métodos *first-action*.

Para a etapa de purificação, foram também ensaiados diferentes procedimentos para extractos diferentes, mas a utilização das colunas de imunoafinidade (IAC) é a melhor documentada para diferentes tipos de alimentos, bebidas, sangue humano, leite e urina devido à sua especificidade (Lino et al., 2006a). As colunas de imunoafinidade (IAC) representam mesmo o estado actual no que diz respeito à purificação da OTA. O extracto é forçado através da coluna e a ocratoxina é ligada ao anticorpo. O analito é eluído com um solvente apropriado (p.e., acetonitrilo). A reacção imunológica é específica para a OTA e como tal, as colunas de imunoafinidade representam uma ferramenta fiável para a purificação da amostra (in http://www.lfra.co.uk/eman2/fsheet2_1.asp).

Visconti et al. (1999) usaram colunas de imunoafinidade para a OTA no vinho e na cerveja após diluição da amostra com uma solução aquosa contendo polietileno glicol e NaHCO_3 . Para amostras de café torrado, foi introduzido uma etapa de purificação com SPE fenil silano antecedendo o uso da coluna de imunoafinidade, para evitar possíveis efeitos nocivos da cafeína. Existem também disponíveis comercialmente colunas de imunoafinidade para a determinação simultânea de OTA e zearalenona (ZON).

Em 1995, Zimmerli and Dick relatam pela primeira vez a ocorrência de ocratoxina A no vinho, especialmente no vinho tinto. O método analítico que usaram envolvia a extração da ocratoxina A por partição líquido-líquido com clorofórmio, purificação numa coluna de imunoafinidade e determinação por LC em fase reversa com detecção por fluorescência (*in* <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>). A maioria dos métodos analíticos actuais para a determinação da OTA em vinho, usa colunas de imunoafinidade comercialmente disponíveis como uma ferramenta para a purificação da amostra. As IACs permitem o isolamento altamente selectivo do analito a partir de uma matriz complexa, no entanto, sofrem de algumas desvantagens devido ao custo relativamente elevado e ao tempo de armazenamento limitado. Comparado com as técnicas de extração ditas tradicionais (e.g., líquido-líquido), estas são menos demoradas e menos erróneas (Leitner et al, 2002).

Existem disponíveis métodos analíticos validados para a determinação exacta e precisa da OTA em milho, cevada, centeio, trigo, farelo de trigo, café torrado, vinho e cerveja. A introdução de colunas de imunoafinidade melhorou consideravelmente os métodos analíticos para a determinação da OTA. O uso destas colunas reduz a necessidade de solventes perigosos, melhora drasticamente a purificação dos extractos, aperfeiçoa a detecção e simplifica a preparação e a purificação da amostra.

Actualmente, o método recomendado e de referência (*European Standard* EN 14133) para a determinação de OTA em amostras de cerveja e vinhos, é baseado no método descrito por Visconti et al. (1999) posteriormente validado num estudo interlaboratorial (Visconti et al., 2001) e adoptado como método oficial para fins de comércio internacional pela AOAC Internacional (AOAC 2001.20, Gilbert and Anklam, 2002).

Este método usa colunas de imunoafinidade para purificação da OTA, após diluição/extracção da amostra numa solução aquosa de polietileno glicol (PEG) (1%) e NaHCO₃ (5%), sendo a separação conseguida, usando HPLC com a fase móvel composta por acetonitrilo/água/ácido acético (99:99:2, v/v/v) e detecção por fluorescência (Ratola et al., 2004). A detecção por fluorescência é a forma de detecção mais frequentemente relatada na literatura, permitindo limites de detecção da ordem dos 0,01 ng/ml. Alternativamente utiliza-se a detecção por espectrometria de massa.

A purificação é geralmente necessária quando são necessários limites de detecção baixos. Aquela pode ser realizada por partição líquido-líquido usando uma solução aquosa Na-bicarbonato ou pela extracção em fase sólida (SPE). Entretanto foram desenvolvidas colunas de imunoafinidade (IAC) baseadas em anticorpos monoclonais para substituir os solventes tradicionais de purificação (Varga and Kozakiewicz, 2006). Diferentes procedimentos de purificação tais como a permuta aniónica e os polímeros *molecular imprinted* (MIP) foram também relatados recentemente (Ratola et al., 2006).

Wolff et al. apresentaram um conjunto de estudos envolvendo amostras de cerveja, vinho, sumos, óleos e vinagre onde a extracção foi efectuada por diluição em PBS e a purificação numa coluna de imunoafinidade. Num outro estudo com amostras de carne e produtos cárneos, a extracção foi feita com uma solução HCl-MgCl₂+CHCl₃ e a purificação usando a partição líquido - líquido com NaHCO₃ e coluna de imunoafinidade. Com amostras de vinho, Ottender and Majerus fizeram uma variação no método acima utilizado, efectuando uma diluição com PBS mas a pH 7.0-7.5 (in <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>).

3.6.3.2 DERIVATIZAÇÃO

Num estudo com amostras de cerveja e vinho, Soleas et al. (2001) fazem referência à derivatização da OTA com bis[trimetilsilil]trifluoroacetamida; Sekiyama et al. (2005) relatam a metilação da OTA com trifluoreto de boro em metanol de acordo com o procedimento descrito por Hunt et al., embora a derivatização da OTA no respectivo éster, seja a técnica mais utilizada e ou referida na bibliografia consultada.

3.6.3.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

A técnica usada na maioria dos estudos conhecidos e portanto, mais extensamente usada para a análise de OTA é a cromatografia líquida com detecção por fluorescência (LC-FLD) (Sáez et al., 2004), nomeadamente o HPLC com detecção por fluorescência (HPLC-FL) devido ao facto da OTA possuir fluorescência natural (Valenta citado em González-Peñas et al., 2006).

Durante os últimos anos, tem-se observado uma tendência para desenvolver e usar técnicas mais económicas e não contaminantes, pelo esforço em reduzir os solventes orgânicos que apresentam custos superiores e ecológicos. A electroforese capilar (CE) foi reconhecida como uma técnica de separação adequada que oferece vantagens por ser um método mais rápido, com maior eficiência e menor consumo de solventes e reagentes (González-Peñas et al., 2006).

Vários métodos analíticos publicados para a determinação de ocratoxina A em milho, cevada, trigo, centeio, vinho, cerveja, e café torrado foram formalmente validados em estudos colaborativos. Os métodos são baseados na cromatografia líquida (LC) com detecção por fluorescência e incluem uma etapa de purificação com extracção em fase sólida com colunas C18 de fase reversa, sílica gel 60 ou colunas de imunoafinidade, podendo garantir a detecção de <0,5 µg/kg. Estes métodos foram também usados com êxito na análise de um certo número de outros cereais, produtos cerealíferos e frutos secados (in <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm#3.0>).

A maioria de métodos para a análise da OTA são baseados em RP-HPLC com uma fase móvel aquosa acídica misturada com acetonitrilo ou metanol (Zimmerli and Dick, 1995). Análises adicionais do extracto são feitas usando o HPLC com detecção por fluorescência (HPLC-FD). Outros métodos de detecção usados incluem a espectrometria de massa (MS/MS) e do fotodiodo *array* (PDA) (Ratola et al., 2006).

O HPLC em fase reversa convencional ou os ensaios enzimáticos (ELISA) providenciam recuperações mais elevadas e um limite de detecção mais baixo em amostras de matrizes complexas. Numa publicação recente, Siantar et al. (2003) compararam o desempenho das

colunas de IA e de SPE, e descobriram que as colunas de IA têm recuperações superiores de OTA quando comparadas com as colunas C18 ou *cross-linked polymer-based SPE* (Varga and Kozakiewicz, 2006).

A LC usando outros métodos de detecção, tais como a *photodiode array* ou a espectrometria de massa (LC-MS-MS) tem sido também relatada. Estes dois métodos de detecção são menos sensíveis do que a FLD mas podem ajudar como ferramentas confirmativas. Além disso, o TLC, o GC-MS do derivado trimetilsilil, a electroforese com fluorescência induzida por laser e o imunoensaio enzimático (EIA) também foram empregues. O método de GC-MS foi relatado como tendo uma pobre sensibilidade, recuperação e baixa precisão. Os métodos de EIA forneceram geralmente valores mais elevados do que a cromatografia (Sáez et al., 2004).

Zöllner et al. (2000) descreveram um método de LC-MS-MS para a determinação de OTA em amostras de vinho usando colunas RP-18 SPE para a preparação da amostra. Embora, o limite de detecção fosse cerca de uma ordem de valor mais alto do que o mais baixo relatado com FL, a aplicabilidade do material da extracção fase reversa para a análise de HPLC-MS foi claramente demonstrada.

Leitner et al. (2002) compararam diferentes métodos analíticos para a determinação da OTA em amostras de vinho, e determinaram que a extracção em fase sólida combinada com a detecção usando HPLC-espectrometria de massa em tandem (MS-MS) e purificação por imunoafinidade combinada com HPLC-deteccção por fluorescência ofereciam bons resultados e comparáveis. No entanto, a determinação com LC-(ESI)MS-MS de OTA em combinação com RP-18 SPE foi apresentada como sendo uma boa alternativa aos protocolos já estabelecidos e eficazes que usam HPLC-FD, pois, apesar da LC-MS possuir uma sensibilidade mais baixa, esta metodologia tem diversas vantagens em termos de preparação da amostra, da fácil automatização e da identificação sem ambiguidade do analito, sem nenhuma etapa consumidora de tempo adicional como é a da confirmação.

O primeiro método LC para determinação da OTA em milho e cevada foi validado num estudo colaborativo com materiais “infectados” com ocratoxina A na escala de 10–50 ng/g.

A ocratoxina A foi extraída dos grãos com clorofórmio: solução aquosa de ácido fosfórico e isolada por partição líquido-líquido em solução aquosa de bicarbonato previamente “purificada” num cartucho C18 (extração em fase sólida). A identificação e quantificação foram executadas por LC de fase reversa com detecção por fluorescência. A identidade da ocratoxina A nas amostras foi confirmada por derivatização com éster de metilo seguida de análise com LC. O método, que é quantitativo para concentrações $\geq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ de ocratoxina A em milho e cevada foi aceite como *final-action* do Método Oficial Internacional AOAC 991.44 (in <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>).

Este método foi sucessivamente sendo validado para outros cereais e para concentrações mais baixas de ocratoxina A (Larsson and Moeller, 1996). Foram usadas amostras de cevada, farelo do trigo e de centeio “infectadas” e ou naturalmente contaminadas que continham ocratoxina A em concentrações de 2-9 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O comité europeu para a padronização adoptou este método como padrão CEN (EN ISO 15141-2) para a determinação de ocratoxina A em cevada, milho e farelo do trigo.

Um segundo método LC, adoptado como padrão CEN (EN ISO 15141-1) para a determinação de ocratoxina A em cereais e produtos cerealíferos, foi validado num estudo colaborativo com trigo contendo 0.4 ou 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ocratoxina A. Esta foi extraída dos grãos com tolueno após adição de HCl e solução de cloreto de magnésio (MgCl_2). O extracto filtrado foi purificado numa minicoluna de sílica gel e a ocratoxina A foi determinada por LC de fase reversa (RP-HPLC) com detecção por fluorescência. A prática e experiência laboratorial mostrou que este método é também aplicável aos cereais, às frutas secadas, às oleaginosas, ao vinho, à cerveja, aos sumos de fruta e ao café cru (in <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>).

Um método mais exacto e mais preciso, foi desenvolvido para a determinação da ocratoxina A em vinhos tinto, rosé e branco (Visconti et al., 1999) e cerveja (Visconti et al., 2001). Após diluição simples com água que contém o polietileno glicol (PEG) e o NaHCO_3 , as amostras de vinho ou de cerveja foram purificadas em colunas de imunoafinidade e analisadas por LC fase reversa com detecção por fluorescência (Serra et

al., 2004). O método foi validado num estudo colaborativo e adoptado como um método *First Action* pelo *AOAC International* (Visconti et al., 2001).

A separação e detecção da OTA é, na maior parte das vezes, conseguida por HPLC-FLD. Outros cientistas determinando a ocratoxina A em trigo usaram o HPLC-RP com coluna C18 e um tampão ácido (ácido acético) numa mistura de acetonitrilo/água como fase móvel, tendo sido observadas recuperações de 70-100%. Reinhard and Zimmerli testaram um certo número de materiais de fase reversa para HPLC e a influência de alguns parâmetros (pH, temperatura) na selectividade da separação da OTA (*in* <http://www.micotoxinas.com.br/ocrafacts.htm>).

A detecção da OTA por TLC pode ser conseguida colocando as amostras e os padrões nas placas de SG-60 e eluídas com uma mistura de tolueno/metanol/ácido acético. Sob a luz UV de comprimento de onda longo a OTA aparecerá com uma cor azul-esverdeada num R_f (valor de retenção) de 0,6.

Para a determinação de OTA em comida para bebés, foi relatado um limite de quantificação de 0.008 µg/kg usando o HPLC com detecção por fluorescência melhorada e reacção pós-coluna com amónia. A LC-MS é uma técnica nova que pode ser usada para identificação e quantificação. Jorgensen and Val (1999) referiram um método para a OTA em farinha usando a LC/MS/MS após derivatização da OTA ao seu derivado metil éster. Após separação com HPLC, a amostra foi introduzida num MS. As amostras foram quantificadas usando a ocratoxina A metil(d3)éster como padrão interno.

Em jeito de conclusão e no que à ocratoxina diz respeito, pode-se dizer que por causa do largo número de produtos por ela contaminados, foram propostos diversos métodos analíticos de LC. Existem disponíveis métodos analíticos validados para a determinação exacta e precisa da OTA em milho, cevada, centeio, trigo, farelo de trigo, café torrado, vinho e cerveja. A introdução de colunas de imunoafinidade melhorou consideravelmente os métodos analíticos para a determinação da OTA. O uso destas colunas reduz a necessidade de solventes perigosos, melhora drasticamente a purificação dos extractos, aperfeiçoa a detecção e simplifica a preparação e a purificação da amostra.

Importa dizer que os Materiais de Referência Certificados (MRC) para várias micotoxinas, incluindo para a OTA, estão disponíveis no “Centro de Investigação Conjunta da UE, Instituto para Materiais de Referência e Medidas”, Geel, Bélgica. O uso destes materiais de referência certificados é muito importante, não apenas para garantir a exactidão dos métodos, mas também para permitir a calibração do equipamento e para validar esses mesmos métodos. Desta forma se garante o controlo dos resultados obtidos por um laboratório com um dado método analítico.

OUTROS MÉTODOS

IMUNOLÓGICOS

O projecto OTA PREV (QLK1-1999-00433) tem como objectivo desenvolver métodos rápidos de monitorização. O desenvolvimento de um ensaio com biossensor e um sistema ELISA para OTA em cereais, usando polímeros impressos molecularmente, e um sistema ELISA conjugado com o PCR baseado na detecção molecular dos for fungos produtores de OTA, estão entre as tarefas do projecto, que é coordenado por Monica Olsen do *National Food Administration* da Suécia (in http://www.lfra.co.uk/eman2/fsheet2_1.asp).

Estão a ser ensaiados outros métodos, como o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e o LC-MS tandem combinado com a extracção em fase sólida (SPE) RP-18, mas estes estão ainda nos estágios primários de desenvolvimento (Ratola et al., 2004). Num recente ensaio interlaboratorial, o método ELISA poderia ser usado com sucesso para determinar o conteúdo de OTA em vinhos e detectar níveis de contaminação comparáveis aos obtidos usando a análise por HPLC.

Schneider et al. (1995) desenvolveram um método ELISA usando fitas de teste que revestem uma membrana de imunoafinidade com anticorpos. As amostras foram extraídas com metanol e o teste foi executado após a filtração e diluição com solução salina tamponizada de fosfato (PBS). O limite de detecção para uma inspecção visual da OTA cifrou-se em 100 ng/g (in <http://www.micotoxinas.com.br/ocrafacts.htm>). Barna-Vetró et al. (1996), Yu et al. (2005) e Zheng et al. (2005) referem o desenvolvimento de métodos imunoquímicos para o rastreio rápido da OTA em vários tipos de alimentos.

Alarcon et al. (2004) desenvolveram um imunossensor electroquímico para a detecção da OTA em vinhos, enquanto Ngundi et al. (2005) desenvolveram um biosensor de *array* para a detecção de OTA em cereais e bebidas. Estes métodos permitem a determinação rápida e com grande confiança da OTA em vários substractos.

A LC-MS é uma técnica nova que pode ser usada para identificação e quantificação. Um método LC/MS/MS deveras interessante foi referido por Jorgensen and Vahl (1999) para a análise e confirmação de OTA em alimentos, nomeadamente farinha, após derivatização ao seu derivado éster metílico. Após separação com HPLC, a amostra foi introduzida num MS e usada a OTA metil(D₃) éster isotopicamente marcada como padrão interno. A comparação de dois métodos diferentes LC/MS/MS, o primeiro baseado numa interface ESI e o último numa interface APCI, foi relatado por Lau et al. (2000).

Um método de GC/MS para a detecção e quantificação de OTA em vinhos foi relatado por Soleas et al. (2001). As amostras foram extraídas em diclorometano, secadas e derivatizadas com bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) de modo a obter-se o derivado trimetilsilil da OTA, que foi analisado por GC/MS no modo *SIM*, monitorizando oito iões específicos.

Dao et al. (2005) relataram a utilização do método de PCR, usando os *primers* AoOTAL/AoOTAR os quais podem ser usados para detectar especificamente o *A. ochraceus*, e os AoLC35-12L/AoLC35-12R para detectar os *fungi* produtores de OTA, *A. carbonarius*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. sulfureus*, *P. verrucosum*. No entanto, mais estudos são necessários para validar a sua aplicação na detecção de espécies produtoras de OTA em alimentos tais como cereais, café ou uvas.

3.6.3.4 CONFIRMAÇÃO

A identidade da ocratoxina foi confirmada em amostras de uva passa secada, usando o HPLC-MS (MacDonald et al., 1999). Jørgensen and Vahl (1999) relatam a confirmação da ocratoxina A em rins de porco e farinha de centeio usando a derivatização da ocratoxina A no éster metílico, e a ocratoxina A metil (d₃) éster como padrão interno. Num estudo com vinhos húngaros, Berente et al. (2005) procederam à confirmação da presença de OTA pela

respectiva conversão quantitativa no seu éster metílico com BF_3 /metanol. Aliás, muitos autores usam o trifluoreto de boro como catalisador para formar o derivado éster metílico da OTA. O uso de ácidos minerais (relacionado com a volatilidade) tais como HCl concentrado e H_2SO_4 , como catalisadores, merecem a preferência dos autores japoneses.

Sibanda et al. (2001) usaram o HPLC para confirmação da OTA em amostras de café verde. Num outro estudo com cervejas de Marrocos, Filali et al., (2001) referem-se à confirmação pela clivagem com carboxipeptidase da molécula de OTA usando o HPLC com determinação fluorimétrica da ocratoxina α ($\text{OT}\alpha$).

Blesa et al. (2004a), num estudo envolvendo cereais, usaram o LC-FLD após metilação da OTA e cromatografia líquida acoplada à espectrometria massa (LC-MS) com uma interface *electrospray* para confirmação da OTA. A confirmação com LC-FD após metilação da OTA é também referida noutros dois estudos, um realizado em molho de soja por Blesa et al. (2004b) e outro em tecidos musculares por Guillamont et al. (2005). Lin et al. (2005) em cafés, cereais, vinhos (tinto) e cervejas em Taiwan, usaram a derivatização química e LC-MS *electrospray tandem* para a confirmação da OTA, enquanto que Medina et al. (2005) referem-se ao LC acoplado à MS *ion trap*, em amostras de uvas espanholas.

Ventura et al. (2003) relata um método usando LC/FLD com confirmação das amostras positivas por LC/ESI-MS (*single quadrupole analyzer*, em modo de ião positivo, *single ion recording* de m/z 404) para a quantificação da OTA em café. A importância do estudo consiste principalmente no facto de um único *single quadrupole MS* ser suficiente para a confirmação por LC/MS das amostras positivas obtidas com LC/FLD. O método foi validado, obtendo uma recuperação de 82.5% e um limite de detecção de 0.1 ng/g.

3.6.4 Patulina

3.6.4.1 EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO

A principal interferência na determinação da patulina é o 5-hidroxi-metil-furfural (HMF) que se forma durante o processamento térmico dos hidratos de carbono presentes nos sumos de maçã. A extracção líquido-líquido e extracção em fase sólida são os métodos tradicionais usados na preparação e extracção da amostra para análise de patulina em

alimentos (AOAC, 1997). Nos últimos anos foram formulados diversos métodos para a extração e purificação das amostras, principalmente sumos de fruta, como os de maçã e de pêra.

A extração com solventes polares, tais como o acetato de etilo ou acetona, é a mais comum. MacDonald and Illida e MacDonald et al. fazem referência a métodos para a determinação de patulina baseados na extração líquido-líquido com acetato de etilo. No entanto, as etapas necessárias de evaporação acabam por ter uma influência negativa na reprodutibilidade. Para além disso, este tipo de extração é muito geral e se não existir nenhuma etapa adicional de purificação, a análise pode ser facilmente distorcida (Boonzaaijer et al., 2005).

A etapa seguinte de purificação pode ser executada com uma coluna cromatográfica usando a sílica gel 60, florisil ou a celite. Um outro método inclui o uso de uma solução de carbonato de sódio como agente de lavagem. As colunas Mycosep™ (#224) podem também ser usadas, sobretudo quando é necessária uma purificação rápida e fácil ([in http://www.micotoxinas.com.br/patufacts.htm](http://www.micotoxinas.com.br/patufacts.htm)).

Vários autores relatam a extração e purificação da patulina conseguida de diversas formas como a seguir enunciadas. Ross et al. (1998) efectuaram três partições, adicionando a 25 ml de sumo de maçã três partes de 25 ml de acetato de etilo, sendo as fases superiores dos extractos combinadas e desidratadas com 10 g de Na₂SO₄ anidro. A seguir procederam a uma purificação em coluna (10x500 mm) contendo 8,5 g de sílica gel 60 G (Merck). O extracto foi eluído com cerca de 100 ml de benzeno-acetato de etilo na proporção 75:25 e seco com ar comprimido.

Num outro estudo, Iha and Sabino (2006) efectuaram a extração com acetato de etilo-hexano. Piemontese et al. (2005) também relatam a extração em amostras de fruta fresca e produtos alimentares contendo frutas com acetato de etilo, tal como Cheraghali et al. (2004) usando sumo de fruta e concentrados, efectuaram a extração por três vezes com acetato de etilo. A fase orgânica foi secada usando sulfato de sódio anidro e a seguir evaporada. A solução foi purificada usando uma coluna de sílica gel com benzeno/acetato

de etilo (25:75). A seguir, o efluente foi evaporado sob corrente de azoto gasoso e por fim dissolvido em clorofórmio. Kawashima et al. (2002) referem-se a extracção da patulina de amostras de tomate, com acetato de etilo e purificação numa coluna de sílica gel, afirmando que o acetato de etilo, popularizado como o solvente de extracção da patulina de amostras de maçãs, era também o melhor solvente de extracção para amostras de tomate, tal como a coluna de sílica gel foi o sistema de purificação que melhor funcionou neste caso.

Sheu and Shyu (1999) desenvolveram um método onde fazem uso da extracção da patulina de sumos por diálise difásica com acilação *in situ* usando um tubo de diálise contendo cloreto de metano como solvente, anidrido acético como agente derivatizante, 4-*N,N*-dimetilamino-piridina como activador da derivatização e nitrobenzeno como padrão interno. Embora o período gasto na extracção seja algo extenso, o resto do método é rápido e conseguindo-se um limite de quantificação estimado de 10 µg/L com uma média de recuperação de 79%. Nesta técnica, uma membrana que contém o solvente orgânico de extracção, é agitada na matriz aquosa, de tal modo que os analitos de baixo peso molecular (de interesse) passam através da membrana, enquanto que as impurezas de peso molecular mais elevado, são retidas na matriz aquosa, permitindo a quantificação de patulina na ordem dos 10 a 250 µg/L.

Gökmen et al. (2005) descrevem duas técnicas de SPE, um usando um sistema *tandem* polivinilpolipirrolidona-octadecil (PVPP-C18) e o outro, usando cartuchos de HLB para análise da patulina em sumos de maçã. Os métodos convencionais de extracção e purificação, usando múltiplas etapas de partição líquido-líquido, usualmente, concentram a patulina presente no sumo de maçã em 5-10 vezes, para atingir uma sensibilidade aceitável na etapa subsequente de determinação e quantificação. Neste caso, os procedimentos de SPE foram otimizados para concentrar a patulina presente no sumo de maçã 10 vezes mais, de modo a aumentar a sensibilidade da detecção.

Portanto como se pode constatar, quase todos os métodos analíticos usados na detecção e determinação da patulina (em produtos de maçã) possuem etapas de extracção e purificação muito similares. O acetato de etilo é o solvente normalmente usado para a

etapa de extracção em produtos aquosos. Por vezes, as soluções, particularmente aquelas resultantes de sumos *cloudy*, requerem uma despectinização antes da extracção.

A determinação quantitativa de patulina por GC/MS é usualmente baseada na extracção prévia e derivatização, tanto como derivados silil ou acetil e requer a patulina isotopicamente marcada como padrão interno, que não está comercialmente disponível. No entanto, como se verá a seguir, existem diferentes técnicas analíticas de detecção. Estas incluem métodos baseados no TLC, GC com derivatização, GC/MS com derivatização e LC (Takino et al., 2003).

3.6.4.2 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Enquanto que os métodos para detectar e quantificar a patulina melhoraram grandemente ao longo dos anos, a sensibilidade destes métodos é ainda um factor limitante em muitos aspectos da investigação e do controlo. Actualmente, não existe qualquer técnica analítica rápida para a análise da patulina, e a metodologia padrão para a quantificação da patulina requer instrumentação dedicada e operadores treinados (Moake et al., 2005).

Para a separação e detecção, vários métodos têm sido propostos, a maior parte envolvendo o GC e a LC com detecção UV. Assim, o HPLC e o GC são os métodos escolhidos preferencialmente, na análise rotineira da patulina.

Os métodos primitivos para a determinação da patulina em sumo de maçã utilizavam o TLC e o método oficial original do AOAC foi aprovado baseado num estudo colaborativo de Scott em 1974. Este método (método 974.18) envolvia a extracção com acetato de etilo e purificação numa coluna de sílica gel.

A cromatografia de camada fina, uni e bidimensional, estavam entre os primeiros e habituais métodos de análise da patulina por serem fáceis de usar e mais económicos. Devido ao facto da patulina ser fluorescente, a detecção pode ser conseguida sem a etapa de derivatização (in <http://www.micotoxinas.com.br/patufacts.htm>).

A patulina pode pois ser detectada usando o TLC, mas o método de análise mais comum e correntemente usado em produtos contendo fruta é o HPLC com detecção UV. A AOAC internacional adoptou este método de LC como *first action method* (método 995.10) para sumos de maçã com um limite de detecção de 5 µg/L (Moake et al., 2005), depois de um estudo colaborativo internacional executado pela FDA (Brause et al. citado em Hopmans, 1997).

Existem outras técnicas usadas na separação e detecção da patulina. Por exemplo, Herry and Lementayer descreveram o uso do HPLC para a separação e o DAD para a detecção. Rupp and Turnipseed escolheram para a derivatização e análise, o GC-MS (Boonzaaijer et al., 2005).

Uma revisão da metodologia analítica usada com a patulina em 1986 concluiu que os métodos de TLC tinham dado lugar a uma predominância das técnicas de HPLC pois estes eram menos demorados, apresentavam uma melhor resolução ao contaminante comum, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e obtinha-se uma sensibilidade melhorada.

Outros métodos utilizados são o GC ou GC/MS e este último é muito útil para a confirmação de resultados (in <http://www.lfra.co.uk/eman2/fsheet6.asp>). Tarter and Scott, (1991) relataram a determinação da patulina por detecção com GC-MS e quantificação do derivado do heptafluorobutirato após tratamento com heptafluorobutirilimidazol (HFBI). Roach et al, 2000 referem que o uso do GC/MS com ionização química do ião negativo permite a detecção da patulina sem ter sido derivatizada em extractos de sumos de maçã minimizando as respostas dos co-extractados.

No entanto, o GC é de entre as técnicas a que encontrou menos uso na análise da patulina, porque o HPLC é um método de maior confiança. A utilização do TLC está a decrescer e o HPLC tornou-se cada vez mais popular. Pode ser usadas conjuntamente com colunas de fase reversa (RP) e a detecção depende do detector escolhido pelo operador. Os detectores simples de UV resultam em limites de detecção de 2 a 10 µg/L, enquanto que os detectores de fluorescência atingem limites de detecção tão baixos quanto 10^{-5} µg/L.

Embora na maior parte das vezes, a preferência para a determinação da patulina fosse para os métodos de HPLC, foram no entanto desenvolvidos alguns métodos de GC. Estes envolviam a formação de derivados éter trimetilsilil com detecção por captura electrónica ou espectrometria de massa. A separação cromatográfica foi efectuada numa coluna capilar não polar revestida com sílica e detecção por captura electrónica. A aplicação desta técnica a sumo de maçã naturalmente contaminado, o qual tinha sujeito a uma extracção com acetato de etilo e purificado usando a cromatografia em coluna de sílica gel, permitiu um limite de detecção de 10 mg/L. Um outro estudo indica que a detecção sobre placas de sílica gel era conseguida pelo borrifamento com 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) com um limite de detecção de aproximadamente 20 mg/L.

Shephard and Leggott (2000) apresentaram um artigo de revisão sobre os métodos analíticos usados na detecção, determinação e confirmação de identidade da patulina concentrando-se nos avanços e desenvolvimentos verificados nos métodos TLC e GC nos 10 anos anteriores.

OUTROS MÉTODOS

Boonzaaijer et al. (2005) desenvolveram um (novo) método seguro para a investigação da ocorrência da patulina em produtos contendo maçã empregando duas etapas prévias de purificação e a análise convencional com HPLC-DAD. Este método é suficientemente sensível para aplicação no controle de qualidade de acordo com as últimas recomendações e exigências da UE. No entanto, referiram que podiam ser conseguidos limites de detecção mais baixos, pela combinação deste método com técnicas mais específicas de detecção como por exemplo, LC-MS/MS.

Ao contrário de outras micotoxinas, não existe disponível comercialmente qualquer *kit* de ELISA para a patulina. Porém, tem sido efectuada alguma investigação sobre a eventual produção de anticorpos de derivados da patulina (in <http://www.micotoxinas.com.br/patufacts.htm>).

Tsao and Zhou (2000) relataram o uso da cromatografia capilar electrocinética micelar (MECC) para a determinação de patulina em sidra. Este método caracteriza-se pelo baixo consumo de reagente e necessidade de 2 ml de amostra para o procedimento. A detecção

foi efectuada com um detector de *array* fotodiodo a 273 nm tendo-se atingido um limite de detecção de 3.8 µg/L.

Um método de HPLC-MS/MS é descrito por [Sewram et al. \(2000\)](#) usando um dispositivo APCI com detector de captura iónica (modo do ião negativo) para análise da patulina em sumos de maçã. A separação por HPLC é conseguida com uma fase móvel de acetonitrilo e água (10:90), resultando num limite de detecção de 4 µg/L.

[Takino et al. \(2003\)](#) apresentaram um estudo comparativo entre APCI e APPI para a determinação de patulina em sumos de maçã e demonstraram que a técnica de APPI era a técnica de ionização ideal por causa das suas elevadas sensibilidade e selectividade. Uma outra vantagem importante ao usar a APPI é o baixo efeito da matriz, para além de um cromatograma mais “limpo”. Nesta base afirmaram ter desenvolvido um método simples de extracção que elimina a necessidade de etapa tediosa de preparação *off-line* da amostra. De acordo com estes dados, o HPLC-APPI-MS parece ser um método conveniente para análise de rotina de patulina em sumos de fruta em quantidades vestigiais.

Foram também relatados métodos alternativos para a quantificação da patulina. Por exemplo, [Lin et al.](#) usaram a densitometria no modo da absorvância-reflectância num comprimento de onda de 275 nm para quantificar as intensidades das manchas de patulina extraídas de uma matriz do milho, enquanto que [Durakovic et al.](#) usaram a fluorodensitometria seguida da formação de derivados fluorescentes da patulina em sumos de maçã, obtidos pela exposição ao vapor de amónia concentrada ([Shephard and Leggott, 2000](#)).

[Rychlik and Schieberle](#) desenvolveram dois métodos - HRGC/HRMS e LC/MS - para a determinação de patulina em géneros alimentícios, com uma extracção prévia e concentrando a toxina com acetato de etilo, usando a ¹³C₂-Patulina como padrão interno. O método GC era baseado numa derivatização com bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e a análise GC/HRMS pela monitorização do ¹²C₂ e ¹³C₂ dos derivados trimetilsilil ([Moake et al., 2005](#)). Um outro método análogo a este (mas sem qualquer padrão interno “marcado”) foi apresentado por [Rupp and Turnipseed](#) para a confirmação

qualitativa da patulina e do 5-hidroximetilfurfural em sumo de maçã por GC/MS com uma fonte de EI e monitorização selectiva dos iões (Sforza et al., 2005).

O HPLC-RP acoplado à detecção UV é uma técnica muito apropriada na determinação da patulina uma vez que a molécula é polar e exibe um forte espectro de absorção. Note-se que a detecção UV pode ser afectada quando outras substâncias interferentes estão presentes, especialmente 5-hidroximetil-2-furaldeído (5-HMF). Os métodos LC/MS são normalmente mais robustos e mais reprodutíveis que os correspondentes métodos GC/MS, embora em muitos casos menos sensíveis. No entanto, dada a não disponibilidade comercial de padrões internos para o GC/MS, o LC/MS é considerado o método indicado para a quantificação e confirmação exacta da patulina. Actualmente, quando se pretende a determinação rotineira de patulina em alimentos, o método LC-UV parece ser o mais adequado. Quando a selectividade é comparada, ambos os métodos GC/HR-MS e LC/MS são mais específicos que a detecção UV.

3.6.4.3 CONFIRMAÇÃO

Os métodos para confirmar a presença de patulina incluem geralmente técnicas mais específicas de detecção tais como a espectrometria de massa (MS) após separação por LC ou GC, permitindo uma confirmação conclusiva da toxina. Os métodos MS-MS fornecem uma selectividade adicional e uma melhor sensibilidade (Sforza et al., 2006). Há relatos da utilização de colunas capilares em equipamentos de *quadrupole*, *ion trap* e de sectores magnéticos para a confirmação da patulina quando presente nos sumos de maçã em níveis entre 68 e 3700 µg/L (Roach et al. citado em Moake et al., 2005).

O método desenvolvido por Kawashima et al. (2002) no qual era usado o HPLC com detecção por *diode array* para a determinação e confirmação da patulina em amostras de tomate, provou ser mais simples, mais rápido e menos oneroso do que outros métodos descritos na literatura devido ao limitado número de etapas e à disponibilidade dos reagentes e adsorventes usados, com a vantagem adicional de permitir a determinação de uma segunda micotoxina, a *verruculogen*.

3.6.5 *Tricotecenos*

Os laboratórios requerem métodos simples, robustos e consistentes para a análise de rotina, com identificação inequívoca da micotoxinas suspeitas. São necessários métodos sensíveis, na ordem dos ng/g, que permitam detectar tricotecenos nos grãos de cereal e produtos alimentares para proteger os consumidores, para providenciar dados sobre a exposição pela dieta e para avaliar a investigação científica no controlo dos fungos e subsequente produção das respectivas toxinas.

Como os tricotecenos encontram-se estruturalmente muito relacionados entre si, os métodos analíticos são normalmente delineados de modo a determinar mais de um tricoteceno. No entanto, os tricotecenos que ocorrem naturalmente em cereais podem ser divididos em substâncias polares “carregando” um grupo cetona em C8 (tricotecenos tipo B) e menos polares (tricotecenos tipo A), os quais não contêm nenhuma função cetona em C8 e apresentam geralmente menos grupos hidroxilo livres (Sforza et al., 2006). Daí que, dependendo do grupo de tricotecenos que está a ser analisado, os procedimentos analíticos geralmente difiram nas etapas de extracção, purificação e de determinação final (Josephs et al., 2004).

3.6.5.1 *EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO*

De entre os métodos cromatográficos, o GC é a técnica mais usada na determinação de tricotecenos, devido à selectividade e sensibilidade, mas também, porque a sua versatilidade facilita o desenvolvimento de métodos para análise de rotina de amostras contaminadas com estas micotoxinas. Os solventes usados na extracção são de carácter polar, como o metanol ou acetonitrilo em misturas com água. Quando se usa o metanol, é necessária uma etapa adicional de clarificação (Oliveira e Valente Soares, 2001).

Radová et al. (1998) descrevem dois procedimentos de purificação para a determinação (múltipla) de sete tricotecenos - desoxinivalenol, nivalenol, diacetoxiscirpenol, fusarenona-X, tetraol T-2, toxina HT-2 e toxina T-2 em extracto de trigo. Na extracção foi usada uma mistura acetonitrilo-água (84:16, v/v) seguida de purificação usando a cromatografia de permeação em gel (gel Bio-Beads S-X3) ou extracção em fase sólida (combinação de florisil e C₁₈-cartuchos SPE de sílica gel ou uma coluna Romer Labs. MycoSep 225). Uma

mistura de acetonitrilo/água/ácido acético na proporção 79:20:1 (v/v/v) foi usada por [Sulyok et al. \(2006\)](#) como o melhor compromisso para a extracção do trigo e do milho.

3.6.5.2 DERIVATIZAÇÃO

Além da etapa de extracção, um outro ponto crítico na determinação de tricotecenos, por GC, é a derivatização, devendo ser efectuada antes do processo cromatográfico, uma vez que não emitem fluorescência, nem absorvem fortemente na gama do UV-Vis ([Sforza et al., 2006](#)). Esta etapa é necessária para melhorar a volatilidade e outras propriedades cromatográficas (e.g., aumento da pressão de vapor dos compostos) dos tricotecenos. Os agentes de derivatização usualmente utilizados são o anidrido trifluoroacético (TFAA), o heptafluorobutirilimidazol (HFBI), o anidrido heptafluorobutírico (HFBA) e o pentafluoropropionilimidazol (PFPI) ([Oliveira e Valente Soares, 2001](#)).

O N,N-dimetil-trimetilsilil-carbamato, um agente sililante comercialmente disponível, foi testado na derivatização de tricotecenos por [Eke and Torkos \(2004\)](#). A sua reacção com álcoois é um processo *non-equilibrium* auto-catalítico, com subprodutos voláteis. Como consequência dessas características vantajosas aquele agente provou ser de fácil uzo e eficaz para a derivatização de todos os tricotecenos estudados, nomeadamente desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) e 4,15-diacetoxyscirpenol (DAS).

3.6.5.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os métodos mais utilizados na análise e determinação de tricotecenos podem ser divididos em duas categorias: os métodos instrumentais – que envolvem o uso do GC com um detector FID, ECD ou de espectrometria de massa ou então um sistema de HPLC com detecção UV ou fluorescência (após derivatização das moléculas) e os chamados métodos rápidos - TLC, ELISA e imunoensaios ([Oliveira e Valente Soares, 2001](#)).

O GC é a técnica mais utilizada na separação, identificação e quantificação de misturas de tricotecenos, embora também sejam utilizados o TLC, HPLC e cromatografia de fluido super-crítico. Os métodos de GC permitem obter limites de detecção na ordem dos 1-10 ppb para os tricotecenos do tipo A e 10-30 ppb para os do tipo de B, embora os LOD's obtidos pelos métodos de HPLC-UV sejam mais elevados (100-200 ppb) ([Sforza et al.,](#)

2006). O GC e ou o TLC são as técnicas que podem ser usadas em tricotecenos do tipo B enquanto que para os tricotecenos de tipo A, o método de quantificação preferencial é o GC com detectores de captura electrónica ou de espectrometria de massa (Samar and Resnik, 2002).

Diversos métodos para determinação de tricotecenos baseados no TLC são incluídos nos Métodos de Análise Oficiais do AOAC Internacional. Os métodos instrumentais mais frequentemente usados na determinação do DON, do HT-2- e da toxina T2 nos cereais e produtos derivados, são baseados no GC com detectores de captura electrónica ou detectores de espectrometria da massa. Mais de 70% da literatura publicada nas últimas décadas está focalizada estas técnicas. Recentemente, o HPLC com detecção por fluorescência e com detecção por espectrometria de massa ganhou maior importância. Uma vez que os tricotecenos não são fluorescentes, o LC/FLD só pode ser usado após derivatização das moléculas com fluoróforos apropriados. As amostras podem ser prontamente confirmadas por GC/MS. No que respeita ao HPLC, a detecção por MS é essencial para detectar selectivamente os tricotecenos não derivatizados (Sforza et al., 2006).

Vários métodos imunoquímicos, especialmente testes ELISA, foram estabelecidos para a determinação de alguns tricotecenos (Josephs et al., 2004). O método escolhido depende da instrumentação disponível, do limite de detecção pretendido, da composição da matriz e das propriedades do analito. Os imunoensaios, juntamente com o TLC, são os únicos métodos de triagem e de confiança disponíveis para a análise rotineira das toxinas T-2 e HT-2 nos cereais. A etapa de extração é geralmente executada com acetonitrilo/água, o metanol ou o clorofórmio/etanol. Os limites de detecção dos testes/ensaios podem ser tão baixos quanto 0.2 a 50 ng/g para a toxina T-2 (in <http://www.micotoxinas.com.br/tricofacts.htm>).

Dall'Asta et al. citado em Sforza et al. (2006), relata o uso de um método LC/MS para a determinação simultânea de tricotecenos do tipo A e do tipo B usando o ESI no modo positivo de ionização com um analisador *single quadrupole* é descrito. A fim de realçar a ionização de ambos os grupos dos tricotecenos, foi usado o ião sódio como agente de cationização adicionando cloreto de sódio ao eluente. Um método empregando a

cromatografia gasosa-ionização química do íon negativo/espectrometria de massa (GC-NICI/MS) foi desenvolvido e usado para a determinação rotineira de oito dos mais significativos tricotecenos numa grande variedade de produtos alimentares. Os métodos cromatográficos, GC, a cromatografia líquida (LC) e fluido supercrítico são correntemente usados na análise de tricotecenos (Lombaert, 2002).

Em 2001, Krska publicou uma revisão exaustiva de métodos analíticos usados na determinação de tricotecenos, mas anteriormente outras revisões incluindo o HPLC e o GC haviam sido levadas a cabo por Langseth and Rundberget. Para os tricotecenos, existem apenas dois métodos padronizados publicados no “*Official Methods of Analysis of AOAC International*”. Um - n.º 986.17, é baseado no princípio do TLC e o outro - n.º 986.18, foi desenvolvido e validado usando o princípio do GC. No entanto, nenhum deles é adequado para suportar as exigências da regulamentação comunitária (Josephs et al., 2004).

Tricotecenos do Tipo A

O HPLC com detecção UV não é aplicável aos tricotecenos do tipo A (porque falta um grupo cetona na posição C-8). As combinações de solventes, geralmente acetonitrilo/água e metanol/água, foram usadas para a extracção do grão, de alimentos e das rações. A extracção é executada misturando a alta velocidade ou agitação mecânica. Para a subsequente purificação são usados cartuchos de sílica gel, florisil e SPE C18. As colunas multifuncionais de MycoSep estão a tornar-se cada vez mais usuais ([in http://www.leatherheadfood.com/eman2/fsheet2_3.asp](http://www.leatherheadfood.com/eman2/fsheet2_3.asp)).

A metodologia de GC é a preferida para a determinação dos tricotecenos do tipo A e é baseada na derivatização dos grupos hidroxilo para aumentar a volatilidade e a sensibilidade. A maioria dos métodos são baseados na trimetilsililação ou na fluoroacilação. Por outro lado, é recomendada a detecção por espectrometria de massa (MS) ou o uso de um detector de captura electrónica (ECD) com um reagente de fluoroacilação. A formação de derivados de fluoroacil por anidrido trifluoroacético (TFA), de pentafluoropropionil (PFP) ou derivados de heptafluorobutiril (HFB) são aplicados para aumentar a sensibilidade do ECD.

Tricotecenos do Tipo B

Os métodos baseados na cromatografia de camada fina (TLC) são ainda comuns e com a introdução de TLC de alta performance (HPTLC), a eficiência da separação e a precisão aumentaram. Os reagentes (por exemplo, ácido sulfúrico ou para-anisaldeído) são necessários para visualizar o único comprimento de onda curto a que absorve o DON. Outros reagentes de aspersion incluem o 4 para-nitrobenzil-piridina ou a nicotinamida em combinação com o 2-acetil-piridina) ou $AlCl_3$, que é o reagente de visualização do DON de maior utilidade. Os limites de detecção típicos por TLC estão na escala de 20-300 ng/g.

Além de TLC, foram recentemente desenvolvidos ensaios imunológicos (ELISA) para fins de rastreio rápidos. Para matrizes menos complexas (cereais puros), estes métodos podem ser usados para a quantificação. A purificação (se necessária) é mínima. Os métodos mais sensíveis de ELISA foram desenvolvidos para o DON tri-acetilado, com um limite de detecção de 0,3-1 ng/g (que requer a acetilação e que dá a soma do DON e dos seus derivados acetilados). Foram também desenvolvidos ensaios de ELISA, os quais permitem a determinação directa do DON com menor sensibilidade (LOD=20-300 ng/g). A quantificação exacta por ELISA é frequentemente limitada, por causa das reactividades cruzadas (*in* <http://www.micotoxinas.com.br/tricofacts.htm>).

A extracção de DON e dos tricotecenos tipo B é executada agitando-se com o acetonitrilo aquoso ou com outros solventes, tais como água/PEG, e clorofórmio/metanol. [Trenholm et al.](#) avaliou procedimentos da extracção para o DON e demonstrou que são necessários tempos mais longos de extracção para amostras naturalmente contaminadas do que para as “infectadas” com padrões. A eficiência de extracção deveria então ser avaliada com amostras contaminadas naturalmente (*in* <http://www.micotoxinas.com.br/tricofacts.htm>).

O material de empacotamento da coluna mais frequentemente usado em cromatografia de coluna é uma mistura de carvão/alumina/celite. As modernas colunas de SPE são uma alternativa aos métodos cromatográficos de coluna convencionais. Embora tenham sido obtidas baixas recuperações para o DON, um novo método de HPLC que utiliza ambas as colunas de carvão/alumina/celite e de IAC comercial deram recuperações razoáveis e um LOQ de 50 ng/g. Um outro desenvolvimento mais recente em métodos de purificação é a

coluna comercial extensamente usada da Mycosep® (#225 para tricotecenos) que permite uma rápida purificação da amostra não sendo necessária nenhuma etapa de lavagem. As substâncias analíticas interferentes são retidas enquanto que os tricotecenos não são adsorvidos no material de empacotamento da coluna (*in* <http://www.micotoxinas.com.br/tricofacts.htm>).

O GC é levado a cabo com detecção por MS, ECD ou MS/MS após derivatização. A escolha do reagente de derivatização depende do tipo de tricoteceno e do método de detecção. O grupo de carbonilo conjugado torna os tricotecenos do tipo B sensíveis ao ECD, enquanto que a sensibilidade acrescentada dos tricotecenos do tipo A, aos quais faltam esse grupo, é obtida quando é usada a fluoroacilação. São então produzidos éteres de trimetilsilil por derivatização de todos os grupos hidroxilo com reagentes tais como TMSI, BSA e TMCS. Quando é usado um único composto, podem ocorrer dois picos para os tricotecenos tipo B, devido à derivatização incompleta. Para obviar este problema, usam-se misturas de derivatização tais como TRI-SIL TBT® e Sylon BTZ (ambos são reagentes de sililação), as quais contêm TMSI (40±5 %), BSA (35±5 %) e TMCS (25±5 %). Performances analíticas características comparáveis às dos métodos de GC podem ser conseguidas com métodos de HPLC e derivatização pré- ou pós-coluna (*in* <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm#3.2.2>).

Desoxinivalenol (DON)

O **DON**, é o tricoteceno do tipo B mais importante pelo que existem diversos métodos oficiais e foram desenvolvidos e validados outros métodos para a sua análise em cereais e outros géneros alimentícios. A cromatografia de camada fina (TLC), a cromatografia líquida, particularmente a de alta performance (HPLC) e os métodos ELISA são os métodos apropriados para rastrear convenientemente o DON e respectiva quantificação. O limite de detecção por TLC, por exemplo, é de 0.2 ppm para o DON e permite a determinação de uma larga escala de concentrações de DON ([Schaafsma et al. 1998](#)).

O GC é comumente usado, particularmente na determinação simultânea de vários tricotecenos nos seus derivados trimetilsilil, pentafluoropropionil, heptafluorobutiril e trifluoroacetil, com detecção por ECD, ionização de chama, MS ou tandem MS. A escolha

do reagente de derivatização depende do tipo de tricoteceno a ser analisado e do método de detecção (in <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm#3.2.2>).

A introdução de colunas melhoradas baseadas em carvão, alumínio e terra modificada de diatomáceas para purificação das amostras antes da determinação por TLC ou GC simplificou e acelerou a análise de desoxinivalenol. O uso de tais colunas em combinação com cromatografia gasosa e detecção por captura de electrões ou espectrometria de massa após a derivatização do desoxinivalenol é a técnica mais comum para quantificar esta micotoxina. Esta técnica permite a determinação simultânea de desoxinivalenol e outros tricotecenos em concentrações de apenas alguns nanogramas por grama, mesmo em matrizes complexas de alimentos (in <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm#3.0>).

No entanto, a matriz pode interferir com os métodos analíticos que usam a cromatografia gasosa. A cromatografia líquida com detecção por fluorescência após a derivatização pós-coluna ou a detecção ultravioleta em combinação com a purificação rigorosa das amostras é uma alternativa apropriada. A cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa pode ser usada para a determinação directa e simultânea de diversos tricotecenos, mas o seu elevado custo inviabiliza o seu uso rotineiro.

Vários métodos usando o HPLC foram publicados sobre a determinação em alimentos e cereais. A separação é usualmente conseguida numa coluna C18 de fase reversa com misturas de metanol/água como fase móvel. O uso de acetonitrilo em vez de metanol em misturas aquosas parece ser uma melhor escolha. Porém, uma etapa de purificação normalmente demorada é necessária para a determinação do DON em matrizes complexas (rações e produtos alimentares).

O método padrão alemão do *Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forschungsanstalten* (VDLUFA) para o DON descrito por Valenta et al. (2002) deve ser aqui mencionado. O método de HPLC proposto inclui uma purificação em três etapas demoradas incluindo a partição líquido-líquido com éter de petróleo, SPE com mistura de carvão/alumina/celite e a utilização de uma coluna de imunoafinidade (in http://www.leatherheadfood.com/eman2/fsheet2_3.asp). Os resultados de um estudo de inter-comparação

recente (Josephs et al., 2001) reflectem o estado actual das técnicas usadas pela maioria dos laboratórios Europeus na análise de desoxinivalenol em cereais.

Para a purificação do DON dos extractos crus foram utilizadas as técnicas de SPE (colunas MycosepTM ou de fluorisil/carvão activo). Adicionalmente foram aplicadas as IAC's e a técnica Extrelut® em combinação com o SPE fluorisil. A determinação do DON foi conseguida por GC-ECD, GC-MS, HPLC-UV/DAD e HPLC-FLD. Para além disso, foram também usados métodos ELISA. Deve no entanto ser enfatizado que os métodos ELISA usados na determinação do desoxinivalenol não conseguem distinguir entre desoxinivalenol, 3-acetildesoxinivalenol, 15-acetildesoxinivalenol e 3,15-diacetildesoxinivalenol, uma vez que os anticorpos são eluídos “contra” o 3,7,15-triacetildesoxinivalenol (*in* <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm#3.0>).

A derivatização pós-coluna, que foi desenvolvida por Sano et al. (1987), envolve a decomposição alcalina do DON e NIV para gerar o formaldeído e reagir com o acetoacetato e acetato de amónio para formar um derivado fluorescente (*in* <http://www.ifa-tulln.ac.at/download/030827094742.pdf#search=%22Sano%20trichothecenes%22>).

Os LOD's dos métodos usados para o DON variaram de 0.30 a 107,9 ng/g. As recuperações individualmente determinadas variaram de 60 a 100% e o CVs relatados variaram de 3 a 15%. Num estudo comparativo organizado por Gilbert, os participantes que usaram TLC para determinação de desoxinivalenol encontraram interferência em extractos de milho. Consequentemente, a maioria dos participantes mudou de TLC para HPLC (*in* <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm#3.0>).

Os limites de detecção típicos para o DON em cereais são 100-1600 ng/g (HPLC-UV), 6-40 ng/g (HPLC-MS), 20 ng/g (HPLC-FLD), 20-50 ng/g e ainda inferiores (GC-ECD) e abaixo de aproximadamente 5 ng/g GC-MS com heptafluorobutilil (HFB) e derivados pentafluoropropionil (PFP)], com recuperações típicas variando de 70-110% (*in* <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je05.htm#3.0>).

Recentemente, alguns instrumentos de LC-MS, particularmente os que usam interfaces de ionização química à pressão atmosférica (APCI), foram usados para a determinação e identificação de tricotecenos em níveis vestigiais. A detecção electroquímica foi também descrita para a determinação da DON (*in* <http://www.micotoxinas.com.br/tricofacts.htm>).

Métodos Fluorimétricos

[Malone et al. \(1998\)](#) descreve uma extracção de etapa única, purificação e a análise fluorimétrica de DON que pode ter utilidade nas instalações de classificação do grão que manipulam um grande número de amostras. Este método pode quantificar o DON em concentrações de 0.5 a 50 ppm sem diluição. As análises individuais são conduzidas em menos de 30 minutos e 24 amostras analisadas em 2 horas. Este método requer um laboratório tradicional com um nível de sofisticação baixo, com moinho, homogeneizador, evaporador e fluorímetro.

As suas vantagens incluem o largo espectro de determinação de DON sem diluição; a flexibilidade para executar amostras individuais ou múltiplas sem impacto significativo no custo por amostra; não é necessário pessoal com muita prática e há menos possibilidade de erro quando comparadas com os métodos cromatográficos; e um custo razoável por amostra. As desvantagens incluem a necessidade de aparelhagem moderadamente cara e espaço disponível no laboratório, o limite de detecção de 0.5 ppm e o tempo que demora a executar uma amostra, embora aquele inclua todos os passos de amostragem do grão (*in* <http://www.graincanada.gc.ca/Cdngrain/fusarium/workshop/2003/3rdCWFHB-2003.pdf>).

Teste ELISA para o DON

Os testes ELISA são dos métodos mais largamente usados na indústria de cereais para o rastreio e quantificação de DON. Estes testes são baseados em reacções onde a toxina e a enzima conjugada da toxina competem pelos sítios de reacção dos anticorpos monoclonais. As enzimas produzem uma cor quando expostas a certos substratos e a concentração da toxina é inversamente proporcional à quantidade de cor. Este método pode ser bastante específico para um composto alvo, tal como o DON mas pode ocorrer a reacção cruzada com alguns metabolitos do DON dependendo do anticorpo usado ([Maragos et al., 2002](#)).

Existem disponíveis no mercado vários *kits* comerciais de ELISA (Diagnostix, 2003; Neogen, 2003; Romer Labs Inc., 2003). Há dois tipos de estojos de ELISA. Alguns apenas informam que a concentração de DON está acima de uma gama de concentrações de controlo, enquanto outros usam uma série de padrões para produzir uma curva padrão da qual a quantidade de DON pode estar quantificada com maior exactidão.

A quantificação de DON por ELISA é limitada pela concepção de cada *kit*. Alguns *kits* têm uma escala de detecção de 0.5 a 5.0 ppm, 0.5 a 6.0 ppm ou 0.2 a 2.5 ppm. As amostras que contenham o DON fora destes limites necessitam de ser concentradas ou diluídas previamente à (re)análise. A maioria de fabricantes destes *kits* semi-quantitativos relatam um tempo de leitura de 20 minutos, mas negligenciam no cálculo deste tempo, a inclusão das etapas de moagem e de extracção da amostra. Executar estes testes demoram, tipicamente, no mínimo 30 minutos, embora uma vez as amostras estejam moídas e extraídas, várias delas podem ser analisadas ao mesmo tempo. A aparelhagem necessária inclui moedor, liquidificador, pipeta multicanal e individual e um leitor de microplacas para as determinações mais exactas.

As vantagens do método semi-quantitativo ELISA são: a sua sensibilidade e a sua especificidade ao DON e metabolitos relacionados, o investimento relativamente baixo em aparelhagem necessária, a acessibilidade e custo razoável de conjuntos de *kits* para um grande número de testes e a ampla aceitação desta tecnologia para esta e outras micotoxinas.

As desvantagens do método ELISA incluem, entre outras, a necessidade de tempo, espaço e de equipamento para a preparação da amostra e respectiva extracção; a pouca ou nenhuma flexibilidade e a ineficiência na execução de amostras individuais; para além da reactividade cruzada com análogos de DON que pode levar à avaliação excessiva de níveis de DON; e o nível moderado de prática e passos que são necessários para executar os testes.

Com a mudança nas directrizes para a saúde relativamente ao DON, o limite de detecção pode também tornar-se um problema, no entanto [Yang et al.](#), relatou que o teste ELISA é

adequado para analisar comida de bebé e amostras de cereais de acordo com os limites legislativos europeus mais rigorosos para o desoxinivalenol (*in* <http://www.grainscanada.gc.ca/Cdngrain/fusarium/workshop/2003/3rdCWFHB-2003.pdf>).

3.6.6 Zearalenona

3.6.6.1 EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO

Para a extracção da zearalenona, os métodos convencionais e principais procedimentos envolvidos incluem, a partição líquido-líquido (extracção L-L), extracção em fase sólida (SPE), colunas de imunoafinidade (IAC) e colunas de purificação multifuncionais. Mais recentemente, outros métodos tais como a extracção por microondas, ultrasonicação e extracção acelerada por solvente foram também aplicados com sucesso à extracção quantitativa da ZEA de diversas matrizes (Urraca et al., 2005). A partição líquido-líquido faz uso de quantidades elevadas de solventes clorados, e quando se usa o clorofórmio e NaOH tem que ser ter o cuidado especial para evitar a hidrólise do anel lactona da ZEA sob condições alcalinas. O uso de SPE requer muita experiência para obter resultados fiáveis e reprodutíveis.

Enquanto a etapa de purificação não é normalmente necessária para os imunoensaios, procedimentos extensos dessa mesma etapa são exigidos antes que os métodos físico-químicos possam ser empregues. A aplicação das IACs e das colunas de purificação multifuncionais na purificação de amostras contaminadas com ZEA está já bem investigada. As moléculas do analito são ligadas a anticorpos e subsequentemente a uma etapa de lavagem a toxina pode ser eluída. Esta caracteriza-se por uma recuperação mais elevada do que a partição líquido-líquido padrão e é geralmente empregue juntamente com a cromatografia líquida de elevada performance de fase invertida (RP-HPLC).

As IACs estão comercialmente disponíveis pela Rhone-Diagnostics (Glasgow, Scotland) e Vicam (Watertown, MA; USA). Ambos os produtos têm um desempenho semelhante. Outro desenvolvimento recente nos métodos de purificação e que é largamente usada comercialmente é a coluna MycoSep™ (#224 para ZEA). Permite a purificação rápida da amostra (30 segundos) e não é necessário nenhuma etapa de lavagem. As substâncias interferentes são retidas enquanto a ZEA não fica adsorvida ao material de

empacotamento. Este método não é apropriado para matrizes complexas tais como alimentos/rações compostos.

3.6.6.2 DERIVATIZAÇÃO

Hetmanski and Scudamore (1991) referem-se à detecção da ZEA em extractos de cereais usando o HPLC com derivatização pós-coluna, o que melhora a resposta fluorescência das micotoxina de *Fusarium*, nomeadamente da zearalenona e zearalenol (quando determinadas por RP-HPLC). A derivatização é baseada numa reacção com cloreto de alumínio o que resulta numa resposta mais selectiva. O método foi testado num grande número de cereais e rações para animais. Schwadorf and Muller (1991) procederam à determinação da zearalenona em amostras de cereais (trigo, cevada, aveia, milho) usando o GC com detecção por *ion-trap* após derivatização por trimetilsililação, sendo esta técnica também referida por Ryu et al. (1996) num estudo em cereais coreanos, colhidos em 1992.

3.6.6.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

As principais técnicas analíticas aplicadas para a análise da ZEA em cereais incluem o TLC, o GC-MS e o HPLC com detecção por fluorescência ou por espectrometria de massa. Os métodos imunológicos tais como o ELISA foram também aplicados como técnicas de selecção/triagem (*screening*) com fins laboratoriais e de controlo oficial. Foi ainda descrito um imunossensor baseado num ensaio competitivo tipo *sandwich* (Urraca et al., 2005).

O método mais popular de separação e detecção da ZEA é o RP-HPLC depois de uma etapa de purificação com IAC's (*EMAN Fact sheets*). A separação das interferências é boa e o limite da detecção para as amostras analisadas com o RP-HPLC-FLD com uma purificação prévia usando as IAC's foi relatado como sendo de 3-6 µg/kg com uma recuperação média de 98-100% na escala de 10-200 µg/kg.

Não existe definido um coeficiente de extinção comum para a fase móvel usada no sistema de HPLC uma vez que são utilizadas diferentes misturas de acetonitrilo e água. Adicionalmente nem sempre é usada a mesma banda/faixa para cálculos o que conduz a resultados diferentes para a mesma amostra. Krska and Josephs (2001) recomendaram um coeficiente da extinção de 12623 ± 111 na banda de 274 nm, que poderia ser medida com

maior exactidão (CV=1.2%) num comprimento de onda de referência de 450 nm. O uso deste coeficiente de extinção comum, que foi obtido durante o projecto SMT-ZON-MAIZE, contribuirá também para uma melhor comparação dos resultados obtidos (*in* <http://www.ifa-tulln.ac.at/download/030827094657.pdf>).

Com a disponibilidade de sistemas de cromatografia líquida, ionização química à pressão atmosférica e detecção por espectrometria de massa (LC-APCI-MS), um novo e poderoso método foi estabelecido para a identificação e quantificação, com o qual se pode conseguir uma elevada sensibilidade e mesmo os extractos crus podem ser medidos sem a etapa de purificação. Após a digestão enzimática é possível uma detecção simultânea de ZON e seus derivados (α/β -ZOL e zearanol). Um outro método caracteriza a detecção directa de ZON com um fluorímetro após a purificação com colunas de imunoafinidade e reacção do analito com cloreto de alumínio hexahidratado. Foram também relatados métodos que usam a TLC, a GC e a GC-MS, mas são de menor importância. Desenvolvimentos futuros irão estar centrados no acoplamento de colunas IAC a sistemas de HPLC-FLD assim como o uso continuado de sistemas LC-MS para identificação e quantificação, que é já actualmente o método mais importante na detecção simultânea de ZEA e α/β -zearalenol.

A zearalenona é medida por HPLC-FLD, geralmente após a preparação com colunas de imunoafinidade. Os limites típicos da detecção variam de 1 a 50 ppb na cevada e no malte e de 1 a 5 ppb na cerveja. Os testes de ELISA estão também disponíveis com um limite de detecção relatado de 50 ppb nos cereais. Um teste oficial ELISA foi adoptado pela AOAC em 1994. É importante observar que a zearalenona é muito sensível a exposição à luz, especialmente quando em solução, pelo que deve ser tomado um cuidado especial no laboratório para evitar a degradação.

OUTROS MÉTODOS

IMUNOLÓGICOS

Diversos métodos imunoquímicos foram desenvolvidos para a determinação de ZEA em cereais, leite e fluidos biológicos. Eles incluem ensaios radioimunológicos (a partir de anticorpos de suínos, bem como ensaios enzimo-imunológicos usando anticorpos

policlonais (de coelhos) e monoclonais (de ratinhos). É também usada a imunocromatografia.

O primeiro tem um LOD de 50 µg/kg e leva 15 min. para efectuar o teste. O último tem um LOD de 250 µg/kg, o qual está acima das directrizes estabelecidas pela maioria dos países europeus. Ambos os *kits* apresentam reactividade cruzada com os derivados da ZEA, α-ZOL e β-ZOL. Um método de ELISA para a ZEA em milho foi estabelecido como um método de rastreio (*First Action Screening Method*) pelo AOAC (concentração ZEA > 800 µg/kg).

3.6.6.4 CONFIRMAÇÃO

Pohiand et al. (1979) relataram a confirmação da identidade da zearalenona obtida pela medição da intensidade de fluorescência utilizando quatro comprimentos de onda de excitação diferentes. Neste procedimento de confirmação, a resposta da fluorescência é comparada com a obtida com o padrão zearalenona sob circunstâncias idênticas.

A identidade desta toxina foi também confirmada por reacções de derivatização e avaliada com os padrões por cromatografia de camada fina. A zearalenona foi acetilada com anidrido acético na presença de piridina como descrito por Golinski and Grabarkiewicz Szczena citado em Sekiyama et al. (2005). Um outro estudo em tecidos animais, refere a confirmação da zearalenona usando o GC/MS (Roybal et al., 1988).

Trigo-Stockli et al. (1996) referem a confirmação da zearalenona, num estudo com amostras de trigo que foram aleatoriamente confirmadas usando a cromatografia gasosa tendo por base procedimentos descritos por Mirocha et al. e Richardson et al. Fazekas and Tar (2001) num estudo em que pretendiam determinar o conteúdo de zearalenona em cereais, efectuaram a confirmação baseando-se no espectro de UV obtido por um detector de *diode array*.

A seguir, na **Tabela 3.4**, apresenta-se um pequeno resumo sobre os procedimentos e metodologias analíticas utilizados na análise e determinação de algumas micotoxinas, compilação feita a partir de uma pesquisa bibliográfica relativamente à última década.

Tabela 3.4 - Resumo sobre as metodologias utilizadas na análise e determinação de algumas micotoxinas

Micotoxina	Matriz	Extracção	Purificação	Derivatização	Método análise	Deteccção	Limite deteccção	Recuperação	Autor(es)	Ano
AF's	Milho	metanol-água 70:30 v/v	colunas de afinidade a AF	reagente o-ftaldialdeído/ β -mercaptoetanol	LC/MS	detector de fluorescência			Abbasa <i>et al.</i>	2006
AFB1	Géneros alimentícios		sem purificação		(ICT) teste imunocromatográfico	banda de leitura fotométrica	2 μ g/kg (ppb)	entre 80.79% (CV, 10.92%) e 110.56% (CV, 7.95%)	Xiulan <i>et al.</i>	2006
AFM1	Leite pasteurizado	250 ml <i>buffer</i> de lavagem (2 X)			teste Ridascreen para aflatoxina M1	fotométrica a 450 nm			Alborzi <i>et al.</i>	2006
AF's	Ervas medicinais	solvente não-clorados	IAC coluna de imunoafinidade		HPLC	detector de fluorescência	0.05–0.1 ng/g		Gómez-Catalán <i>et al.</i>	2005
AFB1	Amendoins, milho e leite inteiro (cru)	água-metanol 20:80 v/v	coluna Vicam com afinidade a AFB		HPLC	sistema MS-LCQ-Mat equipado com interface APCI			Pazzi <i>et al.</i>	2005
Fum	Arroz	acetonitrilo/ água 50:50 v/v	extracção em fase sólida (cartuchos C18, SAX e combinação dos 2)	o-ftaldialdeído e 4-fluoro-7-nitro-benzofurazano	LC	detector de fluorescência	0.010 mg/kg	de 94.6% a 103.6% e de 96.3% a 101.9%	Hinojo <i>et al.</i>	2006
Fum	Milho Portugal	metanol-água 80:20 v/v	IAC FumoniTest	0.05 M <i>buffer</i> borato de sódio, 500 μ L reagente cianido de sódio e 150 μ L reagente NDA	HPLC	detector de fluorescência	20 μ g/kg e 15 μ g/kg		Lino <i>et al.</i>	2006
Fum	Milho	acetonitrilo/ água 75:25, v/v, 50 mmol/L ácido fórmico	desengordurar com fase C18 e purificar com cartuchos Carbohydr-4		método LC/MS/MS; HPLC	monitorizando com um espectrómetro de massa <i>QQ linear ion trap</i>	FB1: \leq 2 ng/g e FB2: 1 ng/g	91–105% (RSD% 8%)	Faberi <i>et al.</i>	2005
Fum	Grãos e alimentos	5 ml/g de acetonitrilo/ água (1/1)	extracção em fase sólida com SAX ou C18		HPLC	<i>Electrospray</i> MS	>2 ppm até 10X menos		Plattner	1999
Fum	Milho	metanol 0.1 M HCl (v/v, 3: 1) seguido de centrifugação			HPLC-ESP-MS		20 ng/g	média: 84.4%	Hartl <i>et al.</i>	1999
OTA	Vinho	clorofórmio			HPLC-FL método validado	deteccção UV	0.07 ng OTA/ml	101%	González-Peñas <i>et al.</i>	2006
OTA	Vinhos Hungria		extracção em fase sólida com cartuchos octadecil-silica		HPLC-FL	detector de fluorescência	0.024 ng/ml	83.5%	Berente <i>et al.</i>	2005
OTA	Cereais	octilsilica (C8)			LC	detector de fluorescência	0.25 e 0.75 ng/g	86% (RSD 5%)	Blesa <i>et al.</i>	2004

Micotoxina	Matriz	Extracção	Purificação	Derivatização	Método análise	Deteccção	Limite deteccção	Recuperação	Autor(es)	Ano
OTA	Uvas	solução 5% NaHCO ₃ e 1% PEG 8000	IAC		LC	detector de fluorescência	0.004 g/kg		Serra <i>et al.</i>	2004
OTA	Vinho tinto	extracção em fase sólida bidimensional (SPE)	C18-silica e um MIP selectivo		HPLC	detector de fluorescência	0.01 ng/ml	>90% (RSD < 10%)	Maier <i>et al.</i>	2004
OTA	Milho	clorofórmio- ácido fosfórico	partição líquido-líquido e chromatografia troca aniónica (SAX colunas)		HPLC em fase reversa	detector de fluorescência	0.02 ng/g	81-94 % a níveis de 3-90 ng/g	Pelegri <i>et al.</i>	1997
PAT	Sumo de maçã	extracção em fase sólida bidimensional (SPE)	tandem PVPP-C18 e um HLB		HPLC em fase reversa	deteccção UV a 276 nm	0.3 µg/l	> 90%	Gökmen <i>et al.</i>	2005
PAT	Maçã e sumo e puré de maçã		2 etapas: coluna C18 SPE; coluna com sílica		HPLC	DAD (diode array) detector		63-112 %	Boonzaaijer <i>et al.</i>	2005
PAT	Sumo de maçã				LC/MS com APPI		1.03-1.50 ng/mL	94.5 a 103.2%	Takino <i>et al.</i>	2003
PAT	Sumo de maçã	acetato de etilo	carbonato de sodio		HPLC	detector UV a 275 nm	1,72µg/L	81,09 e 83,54%	Fernández-Trevejo <i>et al.</i>	2001
PAT	Sumo de maçã	acetato de etilo	carbonato de sodio		HPLC-MS-MS com SRM	MS seguido de APCI	4 µg/L		Sewram <i>et al.</i>	2000
TRI	Trigo irradiado	acetonitrilo/ metanol (14 :1; 40 ml)	coluna fase reversa Lunai C18		HPLC	detector UV a 220 nm	5 ng/g	83.2% num intervalo de 76-100%	Ramirez <i>et al.</i>	2006
TRI	Milho	acetonitrilo/ água	colunas Mycosep	baseado em Schwadorf and Muller (1991); Schollenberger <i>et al.</i> (1998)	GC	detector de massa (<i>ion trap</i>) em modo de ionização electrónica	20 a 120 ng/g	71 a 155%	Milanez <i>et al.</i>	2006
TRI	Grãos e rações	T-2 e DAS: metanol-água (125:125 v/v); DON: acetonitrilo-água (75:25 v/v)			T-2 e DAS: TLC; DON: TLC bidimensional	UV longo	T-2 e DAS: 0.1 mg/kg e DON: 0.01mg/kg	T-2: 85%, DAS: 90% e DON: 93%	Sokolovic <i>et al.</i>	2005
TRI	Cereais	acetonitrilo/ água (84:16 v/v)	coluna MycoSep 227		LC-ESI-MS/MS	detector MS	0.18 a 5.0 ng/g	46 e 95%	Klötzel <i>et al.</i>	2005
TRI	Grãos		colunas de extracção em fase sólida		GC-MS	detector MS	5-15 µg/kg	70.2-125.3%	Jestoi <i>et al.</i>	2004

3.7 MÉTODOS MULTIMICOTOXINAS ou de MULTIDETECCÃO

Vários métodos para a determinação simultânea de micotoxinas têm sido relatados, oferecendo uma vantagem significativa sobre as técnicas convencionais. A determinação das aflatoxinas, da ocratoxina A e da zearalenona foi realizada de acordo com o método descrito por Soares and Rodriguez-Amaya (1989) usando a cromatografia de camada fina. As médias de recuperação foram de 106.6%, 109.4%, 106.6%, 109.4%, 101.8% e 101.7% para as AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA e ZEA, respectivamente (Sekiyama et al., 2005). Kokkonen et al. (2005) analisando nove micotoxinas em matrizes de queijo enunciaram um método que envolvia extração líquida seguida de separação por HPLC e detecção dos analitos com MS. Tal permitiu a determinação das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1, OTA, ácido micofenólico, ácido penicílico e roquefortina C, simultaneamente.

Rundberget and Wilkins (2002) determinaram 13 toxinas de *Penicillium* (OTA, citrinina, patulina, ácido micofenólico, ácido ciclopiazónico, toxina PR, rubratoxina B, verruculogen, chaetoglobosin B, penitrem A, griseofulvina, roquefortina C, ácido penicílico) em amostras de matriz padronizada, feitas de pão, arroz, batatas, vegetais, fruta e outras. O sistema LC-MS utilizado é um instrumento de captura de iões com métodos de ionização por *electrospray* (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI).

Driffield et al. desenvolveram um método de HPLC-MS/MS para a OTA (incluindo o seus metabolitos), zearalenona (ZEA, incluindo os metabolitos α -ZOL e β -ZOL), desoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV) num instrumento *triple quad* com uma fonte de ESI a partir da matriz de fígado de porco. Os limites de quantificação foram tão baixos como 1 ppb (in <http://www.ifa-tulln.ac.at/download/031117082601.pdf>).

Foi desenvolvido um método para a determinação simultânea das micotoxinas de *Fusarium* - nivalenol, desoxinivalenol, fusarenona-X, 3-acetil-desoxinivalenol, a soma de 3-acetil-desoxinivalenol e 15-acetil-desoxinivalenol, diacetoxi-scirpenol, toxinas HT-2 e T-2 e zearalenona em milho usando o RP-LC-APCI-MS/MS. A purificação das amostras de milho foi feita em colunas MycoSep #226 (Berthiller et al., 2005).

Berger et al. (1999) apresentaram um método para a quantificação e confirmação da estrutura de alguns tricotecenos em trigo usando HPLC combinado com espectrometria de massa múltipla (MS(n)). Nove tricotecenos do tipo A- e B- foram determinados (nivalenol, desoxinivalenol, 3- acetildesoxinivalenol, 15-acetildesoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, toxina HT-2, toxina T-2, fusarenona-X e neosolaniol). A extracção foi levada a cabo com acetonitrilo/água, o extracto foi purificado numa coluna MycoSep e a quantificação foi baseada num padrão interno e ionização química à pressão atmosférica (APCI) no modo de ião positivo.

A OTA, CIT e AFB foram extraídas de azeitonas simultaneamente por um método validado *in-house* baseado na partição de solvente, e depois separado por HPLC acoplado a um detector de fluorescência (El Adlouni et al., 2006).

A UPLC/MS/MS (*ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*) é apresentada como uma técnica rápida e sensível que permite a separação das AF's B1, B2, G1, G2 e OTA em apenas 3.2 min. em amostras de cerveja. O limite de detecção é de 1 pg (Ventura et al., 2006).

Um método novo, rápido e sensível é relatado para a determinação multiresidual de tricotecenos do tipo A (diacetoxiscirpenol, toxina HT-2, toxina T-2) e do tipo B (nivalenol, desoxinivalenol, fusarenona X, 15-O-acetil-4-desoxinivalenol) em amostras da farinha de trigo. A extracção da amostra foi efectuada usando misturas de acetonitrilo/água. Foram usadas colunas Mycosep© para uma rápida e efectiva etapa de purificação. Os analitos foram separados por HPLC com uma coluna RP C18 por meio de uma eluição por gradiente e detectados num espectrómetro de massa *ESI-interfaced single quadrupole*. Os tricotecenos do tipo B e tipo A foram monitorizados no modo do ião negativo e no modo do ião positivo, respectivamente. A performance do método é reportada em termos de linearidade ($r^2=0.999$), especificidade, exactidão (recuperações de 70–120%) e precisão (CV%=5), os LOQs encontram-se na ordem dos 10–20 µg/Kg (Biancardi et al., 2005).

O HPLC-TSP/MS foi também utilizado como um método de multidetecção de micotoxinas para a determinação de várias micotoxinas de *Fusarium* juntamente com a ZEA e OTA na

ordem dos 1-40 ng/g. A ZEA foi determinada com a LC e espectroscopia de massa tandem após extração em fase sólida (SPE) de colunas de imunoafinidade (IAC).

A ZEA pode também ser detectada simultaneamente com outros tricotecenos. Por exemplo, a zearalenona e mais 7 diferentes tricotecenos foram identificados numa única “corrida” de GC-MS em cerca de 37 min. Os métodos especificamente projectados para a ZEA foram relatados por Scott et al. e Ryu et al. e existe um vasto leque de métodos disponíveis de HPLC que são normalmente preferidos em relação aos métodos de GC ([in http://www.ifa-tulln.ac.at/download/030827095121.pdf](http://www.ifa-tulln.ac.at/download/030827095121.pdf)).

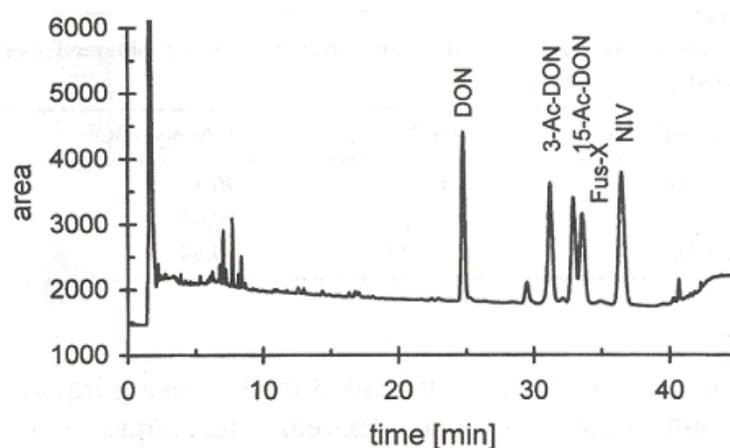


Figura 3.2 - Cromatograma da espiga de trigo adicionada com 500 µg/kg DON, NIV, 3-AcDON, 15-AcDON e Fus X (Weingaertner et al., 1997)

van der Gaag et al. (2003) apresentaram um biosensor para a detecção simultânea de várias micotoxinas (AFB1, ZEA, OTA, DON e FB1). A extração e a purificação das amostras requerem aproximadamente 15 min. Adicionalmente, a determinação e quantificação leva cerca de 10 min., incluindo a regeneração da superfície do sensor, fazendo com que a determinação simultânea das micotoxinas numa amostra demore o total de 25 min. As toxinas de *Fusarium* e *Aspergillus* testadas podem ser detectadas em concentrações relevantes.

Um método geral para a determinação de 16 micotoxinas em rações é descrito por Gimeno (1979). As micotoxinas são extraídas e purificadas pela extração com solventes de diferente pH. A seguir as toxinas são separadas com TLC e depois quantificadas pelo

limite de detecção de método. A concentração mínima detectável de micotoxinas em vários produtos é: aflatoxina B1 ou G1, 4-5 µg/kg; ocratoxina A ou etil éster A, 140-145 µg/kg; citrinina, 600-750 µg/kg; zearalenona, 410-500 µg/kg; esterigmatocistina, 140-145 µg/kg; diacetoxiscirpenol, 2400-2600 µg/kg; toxina T-2, 800-950 µg/kg; patulina, 750-800 µg/kg; penitrem A 14,000-14,500 µg/kg; ácido penicílico, 3400-3650 µg/kg.

Há um outro relato para a determinação simultânea de micotoxinas executada em 3 etapas: extração, purificação e detecção. Para a extração, uma mistura de acetonitrilo-água (60:40, v/v) mostrou ser apropriada. Para a purificação, usou-se a coluna de imunoafinidade “*Afla-Ochra-Zea*”. Após a derivatização com ácido trifluoroacético, as micotoxinas - aflatoxinas, ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) foram quantificadas simultaneamente por cromatografia líquida com detecção por fluorescência. Os limites de detecção em diferentes matrizes após purificação com esta coluna de imunoafinidade foram muito baixo: aflatoxinas, 0.002-0.7 µg/kg; OTA, 0.07-0.25 µg/kg e ZEA, 1-3 µg/kg. Os limites de quantificação foram: aflatoxinas, 0.25 µg/kg; OTA, 0.5 µg/kg e ZEA, 5 µg/kg. As taxas de recuperação destas micotoxinas em centeio e arroz variaram entre 86 e 93% usando um amostra de 0.5 g por coluna de imunoafinidade (Göbel and Lusky, 2004).

4 LEGISLAÇÃO E LIMITES

4.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo procura-se chamar a atenção para a discrepância entre os valores dos limites máximos de algumas micotoxinas admitidos por lei numa grande parte de países, o que leva a que alguns destes possam receber e comercializar produtos que outros não aceitam. Advém daí a necessidade de, por um lado, reduzir a presença de contaminantes nos géneros alimentícios a níveis tão baixos quanto possível, e por outro, harmonizar as legislações dos vários países no que respeita aos teores desses contaminantes, de forma a garantir uma uniformização e igualdade de oportunidades no mercado e um elevado nível de protecção da saúde pública, nomeadamente dos grupos mais sensíveis da população.

Desde a descoberta e identificação das aflatoxinas nos anos 60, que muitos países têm procurado estabelecer (e foram já estabelecidos) regulamentos para proteger o consumidor dos efeitos prejudiciais das micotoxinas.

O reconhecimento de que as aflatoxinas e outras micotoxinas podem causar doenças nos seres humanos e nos animais levaram à definição de limites que por sua vez vão sendo ajustados, embora frequentemente de uma forma *ad hoc*.

A União Europeia tem tentado harmonizar a legislação por entre os vários Estados-Membros mas vários são os factores que influenciam e interferem no processo de formulação e tomada de decisão na definição de limites para micotoxinas existentes nos alimentos para humanos e nas rações para animais.

De entre eles, salientam-se os de natureza científica e sócio-económica, como por exemplo, a disponibilidade de dados toxicológicos, de dados relativos à presença de micotoxinas nos diversos produtos básicos, o conhecimento sobre a ocorrência e distribuição das micotoxinas num lote; a disponibilidade de métodos analíticos; a legislação dos países com os quais existem contactos comerciais e a necessidade de um abastecimento suficiente e sustentável de alimentos.

Os dois primeiros factores proporcionam, respectivamente, a informação necessária para a avaliação do risco e para a avaliação da exposição. Os dados disponíveis não são suficientes de modo a permitir estabelecer níveis regulamentares baseados numa correcta avaliação de riscos para a saúde animal e humana. Por isso, na prática, verifica-se que outros critérios, designadamente de natureza económica, política e técnica (limite de detecção dos métodos existentes) são usados como base de fixação destes níveis.

Os factores económicos e políticos também têm um impacto apreciável, atendendo aos interesses comerciais e à garantia do fornecimento satisfatório de alimentos às populações. Há que ter em conta que, com a existência de regulamentações muito restritivas, poderiam ocorrer problemas ao nível da disponibilidade de produtos alimentares básicos nos mercados, a preços razoáveis o que teria implicações na agricultura, especialmente na agricultura de subsistência dos países em vias de desenvolvimento.

Com vista a limitar esta subjectividade do estabelecimento de níveis regulamentares a adoptar, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos, a avaliação de dados toxicológicos e a avaliação dos riscos.

Os organismos responsáveis pela saúde pública são confrontados com um complexo problema associado à presença de micotoxinas nos alimentos. De facto, tais micotoxinas, em particular a aflatoxina, pelos riscos que comportam deviam ser banidas totalmente dos alimentos. Contudo, estes produtos tóxicos estão presentes nos alimentos como contaminantes naturais, pelo que a sua presença, desde que em níveis que não atinjam determinados limites, terá que ser tolerada.

Por outro lado, no estabelecimento de níveis máximos deverá considerar-se a necessidade de harmonização da regulamentação dos diferentes países, para que um país importador possa obter os produtos considerados essenciais e para que os países exportadores possam encontrar mercado para os seus produtos.

É por isso, uma prioridade, a regulamentação e estabelecimento de limites máximos destes resíduos de modo a torná-los coincidentes a nível mundial.

Por exemplo, em finais de 1997 foi levantado um problema através dos órgãos de comunicação social, sobre pistácios vindos do Irão que entraram em Portugal, contaminados com aflatoxina B1, e cujos limites eram muito superiores aos tolerados para consumo humano o que levou a que fossem retirados do mercado.

Apesar das dificuldades, nas últimas décadas muitos são os países que adoptaram regulamentos e estabeleceram já limites para os teores de algumas micotoxinas em alimentos para humanos e rações para animais e ainda se verifica a promulgação de novas disposições normativas. Para se ter uma ideia, na UE até 2002 as únicas micotoxinas regulamentadas eram as aflatoxinas (Regulamento (CE) n.º 466/2002 de 8 de Março). A seguir foram estabelecidos limites para a ocratoxina A (Regulamento (CE) n.º 472/2002 de 12 de Março) e só no segundo semestre de 2003 foram estatuídos limites para a patulina (Regulamento (CE) n.º 1425/2003 de 11 de Agosto).

Adicionalmente outros limites legislativos para o desoxinivalenol (DON), fumonisinas, toxina T-2, HT-2 e zearalenona (ZEA) encontram-se em fase de discussão e ou aprovação.

Existem regulamentos nacionais para várias micotoxinas, como por exemplo, aflatoxinas, aflatoxina M1, tricotecenos, desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, toxina T-2 e toxina HT-2, fumonisinas (B1, B2 e B3), ácido agárico, alcalóides de *ergot*, ocratoxina A, patulina, esterigmatocistina e zearalenona. Contudo, tais limites são ainda muito variáveis, verificando-se que os países que produzem produtos agrícolas em zonas tropicais e subtropicais têm limites legais mais elevados, ou nem sequer os têm, enquanto que as nações de zonas mais frias ou de climas mais moderados têm limites mais reduzidos.

Tem existido uma grande evolução no que concerne aos teores de aflatoxina admissíveis em produtos para alimentação humana e animal. Estes teores têm baixado na razão directa do aumento da sensibilidade dos métodos de análise e do conhecimento dos efeitos das aflatoxinas nos animais e no Homem. Por conseguinte e face à evolução dos métodos analíticos, os limites estabelecidos estão hoje ultrapassados. Por outro lado a designação "aflatoxina" refere-se apenas à AFB1, sendo por isso imprecisa.

No que diz respeito a géneros alimentícios há uma preocupação em harmonizar a legislação portuguesa com a comunitária.

Em 1997 foi publicado um Estudo da FAO: “*Food and Nutrition, 64*”, que fazia a resenha completa dos regulamentos vigentes a nível mundial. Por essa altura, apenas 77 países tinham regulamentos específicos para as micotoxinas em diferentes alimentos para humanos e alimentos para animais, 13 países dispunham de disposições gerais e cerca de 50 países não apresentavam informação disponível.

O número de países com regulamentações específicas para as micotoxinas tem aumentado ao longo dos anos, reflectindo a preocupação dos governos sobre os efeitos potenciais das micotoxinas sobre a saúde humana e animal bem como as suas consequências comerciais.

Foi recentemente publicado um outro estudo da FAO levado a cabo durante os anos de 2002 e 2003 e que actualiza a informação do Estudo de 1997 atrás citado, apresentando a situação dos regulamentos para as micotoxinas a nível mundial até Dezembro de 2003 (Figura 4.1).

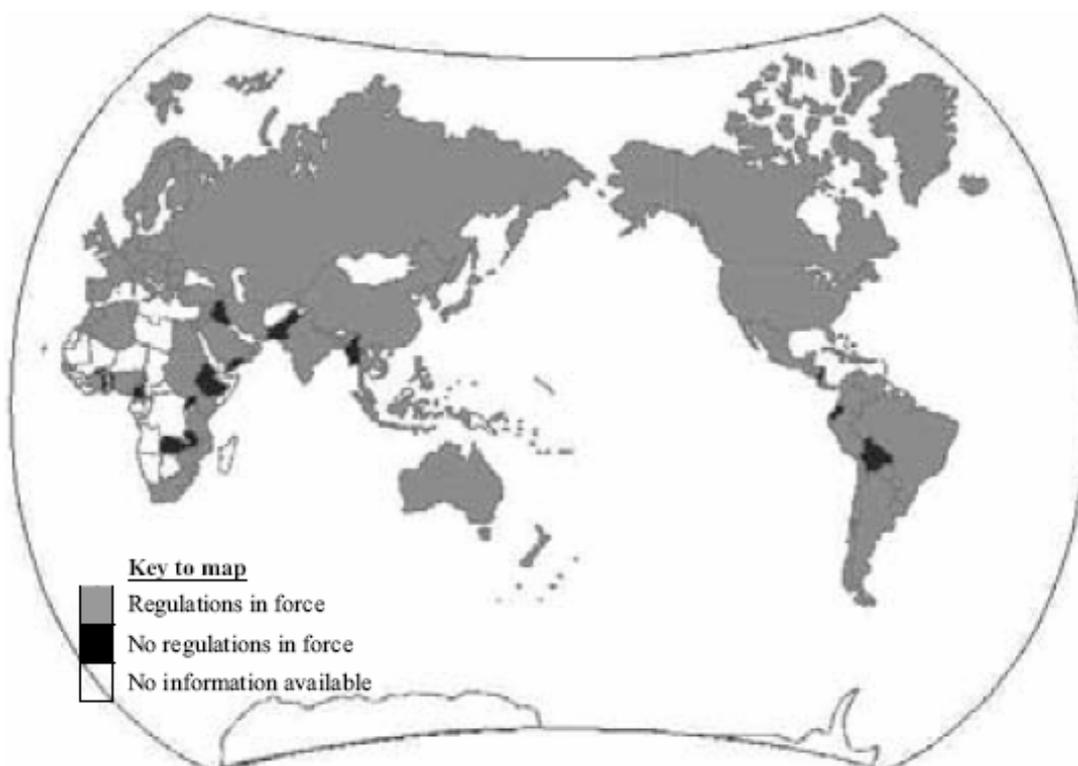


Figura 4.1 Situação dos regulamentos para as micotoxinas a nível mundial

Em 2003, pelo menos, 99 países tinham regulamentos para as micotoxinas em alimentos para humanos e/ou em rações para animais, verificando-se um aumento de aproximadamente 30 por cento quando comparado com 1995. Comparando a situação em 1995 com a do ano 2003, resulta que neste último ano há mais micotoxinas regulamentadas, em mais produtos básicos e em outros produtos, embora os limites toleráveis permaneçam, geralmente nos mesmos valores ou tendam a diminuir.

Os regulamentos são mais variados e detalhados, com novos requisitos relativos aos procedimentos oficiais de amostragem e às metodologias analíticas. Ao mesmo tempo, observa-se uma certa harmonização ou um esforço no sentido de harmonização dos vários regulamentos por entre os países integrantes das várias comunidades económicas (Austrália/Nova Zelândia, UE, MERCOSUR).

É preciso notar que a harmonização é um processo lento pois está muito dependente dos pontos de vista e interesses comerciais (e não só) das diferentes partes envolvidas no processo. Também é preciso levar em linha de conta que os limites harmonizados serão benéficos do ponto de vista das trocas comerciais, embora se possa argumentar que daí não resulta necessariamente uma protecção eficaz e homogénea da saúde humana, uma vez que os riscos relacionados com as micotoxinas dependem tanto do perigo como do nível de exposição.

Por curiosidade, supõe-se que foi por volta do ano 1970 que se fixou o primeiro valor limite para as micotoxinas e daí para cá tem crescido progressivamente o número de países com limites para as micotoxinas de pelo menos 31 em 1981, 56 em 1987, 77 em 1995 até aos actuais 99 países em 2003. Extrapolando esta tendência, aparentemente linear, será de esperar que cerca de 120 países venham a contar com limites para as micotoxinas no ano de 2010.

Portugal, desde 1973, pertence ao grupo dos países que criaram legislação sobre o teor de aflatoxinas em alimentos para animais, através da [Portaria n.º 671/73](#), tendo sido posteriormente actualizada pela [Portaria n.º 62/97](#). Perante a actual legislação (a [Portaria n.º 16/97](#)), já é possível dispor de um método oficial de análise.

Ao mesmo tempo que se verificava o lançamento da primeira legislação europeia sobre o assunto, em 1971, esboçou-se uma tendência de uniformização entre a normativa em vigor nos vários países. Apesar disso, mesmo entre países da Comunidade Europeia (agora UE) continuava a não existir uma concordância total sobre os limites máximos dos resíduos.

4.2 LIMITES MÁXIMOS e ou RECOMENDADOS

Para se ter uma breve ideia sobre o atrás exposto, atenda-se aos seguintes exemplos. Na Alemanha, a partir de 1976, o limite de aflatoxina B1 para cereais e oleaginosas não podia exceder 0.005 ppm ou um limite superior a 0.01 ppm do conjunto das aflatoxinas B1, B2, G1, e G2; na Dinamarca, através de *Statutory Order by the Agriculture Ministration*, de 22 de Outubro de 1968, foi estipulado que o teor máximo de aflatoxina seria de 0.1 ppm. Em Inglaterra, desde de 1965, altura em que as recomendações da *Compound Animal Feedingstuffs Manufactures National Association*, foram transformadas em legislação referente à exportação de bagaços de amendoim, o limite máximo admissível era de 0.05 ppm para alimentação humana e 0.1 ppm para alimentação animal. Em 1986, a *Food Advisory Committee* recomenda que o limite de 0.1 g/kg seja aplicado a todos os tipos de nozes e produtos à base de nozes para consumo humano; em Itália, o Ministério da Saúde, proibiu, a partir de 1965, a importação de produtos contendo mais que 0.05 ppm, quer se destinassem à alimentação humana ou animal; na Noruega, desde 1972, que o Ministério da Agricultura proibia a importação de bagaços de oleaginosas que apresentassem mais de 0.6 ppm de aflatoxina B1. Paralelamente foi estabelecido que a incorporação de bagaço de amendoim em alimentos compostos deveria ser de 8%; finalmente, na Suécia, passaram a existir, a partir de 1979, disposições legais que estabeleciam que o teor máximo de aflatoxina permitido em qualquer alimento seria de 0.005 ppm (Amado, 1999).

Outros países, como a França, a Bélgica e a Holanda, alteraram os limites previamente estabelecidos, passando a seguir o estipulado na legislação da UE. Esta tem vindo a criar e a actualizar a legislação relativa a este domínio. Um Regulamento da Comissão estabelece o limite máximo de 5 µg/kg para a **aflatoxina B1** e de 10 µg/kg para a **aflatoxina total** para algumas espécies, i.e., *Capsicum spp.* (incluindo pó de chilli, *cayenne* e páprica), *Piper spp.* (pimenta branca e preta), *Myristica fragrans* (noz moscada), *Zingiber officinale* (gingibre), *Curcuma longa* (curcuma).

Tendo tomado consciência dos malefícios e consequentes repercussões para a saúde pública e ao nível económico, muitos países têm vindo a criar, ao longo dos anos, legislação ou recomendações, com o objectivo de proteger a produção animal das consequências do consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas. Esta preocupação é também notória nos países terceiros (não pertencentes à UE).

Enumerando alguns exemplos, no Canadá e Polónia as disposições dizem exclusivamente respeito a produtos para alimentação humana e por isso o teor permitido é zero (segundo a sensibilidade dos respectivos métodos de análise); nos EUA o limite máximo de aflatoxina admitido, segundo a *Food and Drug Administration*, era de 0.02 ppm em produtos tanto para alimentação humana como animal, já antes de 1973. Exceptuam-se aqui os amendoins com casca, nos quais o limite é alargado para 0.025 ppm. Segundo [van Egmond](#), o limite de aceitação de um lote no E.U.A. é de 20 µg/kg de aflatoxina; no Brasil, a legislação que se conhece diz respeito a produtos para exportação que, segundo o Dec. n.º 479 de 2 de Setembro de 1965, não deve ultrapassar 0.05 ppm. [Abia](#) refere que o limite de aceitação de um lote no Brasil é de 30 µg/kg de B1+G1, valor considerado elevado internacionalmente; na Índia, segundo recomendações do *Indian Standards Institute*, o limite máximo de aflatoxinas para amendoins é de 0.05 ppm; em Israel, a *Sored Products Research Lab* estabelece que qualquer matéria prima não deve ser utilizada com um teor de aflatoxina B1 superior a 0.02 ppm; no Malawi, segundo regulamentação que diz respeito às exportações, o amendoim não deve conter mais do que 0.005 ppm de aflatoxina B1 ([Amado, 1999](#)).

A legislação de 1971 referia-se apenas a aflatoxinas, tendo em 1974 sido corrigido para aflatoxina B1. Também se verificou entre estas duas legislações, um abaixamento de todos os níveis de aflatoxina B1 permitidos nos alimentos para animais, um abaixamento muito significativo de 1.0 ppm para 0.05 ppm em alimentos simples, devendo-se este facto também à mudança verificada no conceito de alimento simples.

Considerando a necessidade de reduzir o teor de [aflatoxina B1](#) nos alimentos destinados à alimentação animal, Portugal, à luz da Portaria n.º 62/97, estabelece o teor máximo de aflatoxina B1 em alimentos simples, matérias primas e alimentos compostos, teores estes

que se situam entre 0,005 mg/kg (ppm) em alimentos completos para gado leiteiro e 0,01 mg/kg (ppm) em alimentos completos para vitelos e borregos.

No caso da **aflatoxina M1** a Comunidade Europeia e o *Codex Alimentarius* prescrevem que o nível máximo no leite líquido e em pó ou produtos lácteos processados não deve exceder 50 ng/kg (*Codex Alimentarius*, 2001). No entanto, de acordo com a regulamentação vigente nos EUA o nível de AFM1 no leite não deve ser superior a 500 ng/kg. Na Áustria e na Suíça o limite máximo é ainda mais reduzido a 10 ng/kg para alimentação destinada a bebés e crianças (FAO, 1997). Existem assim diferenças no limite máximo admissível de AFM1 em vários países, e muitos nem sequer têm nenhum limite legal para AFM1 em leite e produtos lácteos (Kamkar, 2005).

O Regulamento comunitário (CE) N.º 466/2001 de 8 de Março de 2001 estabelece máximos de 2 µg/kg de **AFB1** em nozes, frutos secos e cereais e 4 µg/kg para o somatório das **aflatoxinas B1, B2, G1 e G2**. Para o leite o máximo permitido de **AFM1** é de 0,05 µg/kg.

Para a **ocratoxina A** foi estabelecido um limite de 5 µg/kg para grãos de cereal cru e para produtos derivados de cereais (incluindo produtos cereais processados e grãos de cereal destinados ao consumo humano directo) de 3 µg/kg existindo, ainda que provisoriamente, um limite máximo de 10 µg/kg para frutos secados da videira (uvas, passas e sultanas).

Para a **patulina** em sumos de fruta, em particular no sumo de maçã e no sumo de maçã como ingrediente noutras bebidas, no sumo de fruta concentrado reconstituído e néctar de fruta existe um nível máximo de 50 µg/kg.

Há uma recomendação, de Outubro de 2002, do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e Saúde Animal para estabelecer os níveis de **patulina** em sumo de maçã em 50 µg/kg, sugerindo a implementação de medidas com o objectivo próximo de o diminuir até um nível de 25 µg/kg (in http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/toxic/summary06_en.pdf).

Para as bebidas espirituosas, cidra e outras bebidas fermentadas derivadas de maçãs ou contendo sumo de maçã, é proposto um limite máximo de **patulina** de 50 µg/kg. Para produtos sólidos de maçã, incluindo compota de maçã e puré de maçã, é proposto um limite máximo de 25 µg/kg. Para o sumo de maçã pronto a beber e produtos sólidos de maçã, incluindo a compota da maçã e o puré de maçã para bebés e crianças, etiquetados e vendidos como tal e outra comida para bebé, é proposto um limite máximo de **patulina** de 10 µg/kg.

Não existe regulamentação actual no que diz respeito ao nível máximo tolerável dos **tricotecenos** (a toxina T-2, DAS e DON) e da fumonisina B1 em alimentos para humanos. O Comité Científico da Alimentação Humana estabeleceu uma TDI de 2 µg/kg peso corporal/dia para o grupo **fumonisinina B1, B2 e B3** (in http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out185_en.pdf). Para as **fumonisininas** a FDA estabeleceu os seguintes teores de referência para as fumonisininas totais (B1+B2+B3) em produtos alimentares (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1 - Teores de referência para as fumonisininas em produtos alimentares

Produtos alimentares	Fumonisininas Totais (FB1+FB2+FB3)
Produtos de milho sem gérmen moído seco	2 ppm
Produtos de milho total/parcialmente sem gérmen moído seco	4 ppm
Farelo de milho moído seco	4 ppm
Milho limpo para pipocas	3 ppm
Milho limpo para produção de massa	4 ppm

A Tabela 4.2 apresenta a gama de limites para algumas micotoxinas e a Tabela 4.3 os níveis máximos aceitáveis para as aflatoxinas em alguns países.

Tabela 4.2 - A gama de limites para micotoxinas (*Basic Food Safety for Health Workers*)

Micotoxina	Limite Regulamentar (µg.kg ⁻¹)	N.º de países
Aflatoxina em alimentos	0*	48
Aflatoxina M1 em leite	0* - 1	17
Desoxinivalenol em trigo	1000 – 4000	5
Ocratoxina em alimentos	1 – 300	6
Patulina em sumos de maçã	20 – 50	10
Toxina T-2	100	2
Zearelanona	30 - 1000	4

* Limite de determinação

Tabela 4.3 - Níveis máximos aceitáveis para **aflatoxinas** em alguns países (*Basic Food Safety for Health Workers*)

País	Limite (mg.kg ⁻¹)	Género alimentício
Reino Unido	2	Nozes, figos secos e seus derivados
	5	Nozes, figos secos e seus derivados mas com pretensões a processamento adicional
Estados Unidos da América	20	Aflatoxinas totais em todos os alimentos
	0.5	AFM1 em leite inteiro, leite com baixo teor em gordura e leite desnatado
Austrália	5	Todos os alimentos com exceção dos produtos de amendoim
	15	Produtos de amendoim
Índia	30	Todos os alimentos
Japão	10	Todos os alimentos
China	50	Arroz, amendoim, milho, sorgo, feijão, trigo, cevada e aveia

(Obs.: Quando se diz Aflatoxina refere-se a Aflatoxina B, a menos que seja indicado de outra forma)

Mais recentemente, em 16 de Julho 1998, surge o Regulamento (CE) N.º 1525/98 da Comissão que altera o Regulamento (CE) n.º 194/97 e fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, entre os quais as aflatoxinas, cujos valores para amendoins, frutos de casca rija e frutos secos são: para a AFB1 entre 2 µg/kg e 8 µg/kg; para as B1+B2+G1+G2 entre 4 µg/kg e 15 µg/kg e para a AFM1, 0,05 µg/kg.

Relativamente ao homem não está ainda demonstrada uma relação causa-efeito entre as aflatoxinas e o cancro do fígado, pois, se por um lado, existem as limitações de experimentação no homem, por outro lado, a natureza do processo carcinogénico envolve uma latência prolongada. Temos ainda que ter em conta as dificuldades que existem em considerar as aflatoxinas como os agentes causadores de envenenamento no homem depois da ingestão de alimentos contaminados, até porque há alimentos onde coexistem várias micotoxinas. Por outro lado não se pode descurar a interferência de outros factores, como sejam, a má alimentação, parasitas, hepatite visceral, alcoolismo e os diversos contaminantes.

Em muitos países do mundo, particularmente nos trópicos, muitos casos de intoxicação no homem foram atribuídos às aflatoxinas. Atenda-se ao exemplo de Taiwan, onde 26 pessoas sofreram intoxicações quando consumiram durante 3 semanas, arroz bolorento. Em duas

amostras deste arroz foram detectadas aproximadamente 200 g/kg de aflatoxinas. Das 26 pessoas morreram três crianças nas quais se manifestaram edemas nas pernas, dores abdominais, vômitos, fígado palpável, mas não tinham febre.

Outro efeito e sintoma que vulgarmente aparece no homem depois de intoxicação com aflatoxinas é a cirrose, caracterizada por infiltração gorda nas células do fígado, levando a degeneração celular, fibrose e hepatomegalia. Os sobreviventes de uma epidemia registada no Quênia, Tailândia e Moçambique demonstraram uma boa correlação entre a ingestão de aflatoxinas e a incidência de hepatocarcinomas. Embora estas investigações não possam provar a validade da hipótese, a evidência é tal que esta é a melhor hipótese para estas áreas do mundo com elevada incidência de carcinoma.

No que diz respeito à **ZEA** e seus metabolitos, usando um factor de segurança de 100 e considerando um NOEL (*no-observed-effect-level*) de 40 mg/kg pc/dia (baseada na dose que não apresentou efeitos hormonais em porcos, a espécie mais sensível), a JECFA estabeleceu uma dose PMTDI de 0.5 mg/kg pc/dia. O Comité Científico da Alimentação Humana estabeleceu uma TDI para **zearalenona** de 0,2 µg/kg de peso corporal. A ingestão diária média na Suíça foi estimada em <0,02 µg/kg peso corporal/dia (*in* http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf).

Alguns países nomeadamente Áustria, Brasil, França, Itália, Roménia, Rússia e Uruguai têm regulamentos específicos para a **ZEA**, variando de 0.03 mg/kg a 1 mg/kg, que são aplicáveis tanto a géneros alimentícios específicos como a todos os alimentos. No entanto, não existe um limite máximo internacionalmente harmonizado para a **ZEA** (FAO, 1995; Urraca et al., 2005).

4.3 LIMITES MÁXIMOS CONSOLIDADOS

Os mais baixos limites legais relativos à aflatoxina encontram-se consignados na legislação dos países nórdicos e da Suíça. Na Suécia, provavelmente o país mais restritivo da Europa, os limites para aflatoxina B1 são mais baixos do que nos países da UE. No entanto, a tendência actual será no sentido dos estados-membros virem a adoptar limites inferiores aos presentemente existentes.

Em Portugal, à semelhança do que acontece nos restantes países da CE, só existem limites legais estabelecidos para as aflatoxinas. No que se refere a alimentos para consumo humano, em Portugal os limites máximos permitidos (Tabela 4.4), encontram-se indicados no Decreto-lei n.º 6/83.

Tabela 4.4 – Limites máximos de **Aflatoxina B1** permitidos em alimentos para consumo humano em Portugal

Micotoxinas	Produto	Limite máximo (ppb)
Aflatoxina B1	Amendoim	25
	Alimentos dietéticos e de regime para crianças	5
	Restantes alimentos	20

No caso das rações para animais, a legislação contempla os alimentos que são directamente consumidos por aqueles, distinguindo entre alimentos simples, completos e complementares e as matérias-primas que se destinam a ser integradas nos alimentos compostos. A legislação existente tem ainda em atenção as espécies a que se destinam os alimentos e as diferentes fases de desenvolvimento dos animais. Os limites legais a respeitar (Tabela 4.5) estabelecidos pela Portaria n.º 1107/89, complementada pela Portaria n.º 62/97, são baseados nas Directivas 74/63/CE e 96/6/CE.

Tabela 4.5 - Limites máximos de aflatoxina B1 permitidos em rações para animais em Portugal

Micotoxinas	Alimentos para Animais	Teor máximo (mg/kg)*
Aflatoxina B1	Matérias primas	0,2
	Alimentos simples, excepto amendoim, copra, palmiste, grãos de algodão, <i>babassu</i> e milho, bem como os derivados da sua transformação	0,05
	Alimentos completos para bovinos, ovinos e caprinos, excluindo gado leiteiro	0,02
	vitelas e borregos	0,05
	Alimentos completos para suínos e aves, excepto os destinados a animais jovens	0,005
	Outros alimentos completos	0,01
	Alimentos complementares para bovinos, ovinos e caprinos, excepto os destinados a vacas leiteiras, vitelas e cordeiros	0,02
	Alimentos complementares para suínos e aves, excepto os destinados a animais jovens	0,05
	Outro alimentos complementares	0,03
		0,005

* Teor máximo em mg/kg de um alimento para um teor de humidade de 12%

Na **Tabela 4.6** apresentam-se os limites regulamentares e consultivos em vigor na UE compliados até Setembro de 2004.

Tabela 4.6 - Micotoxinas: Limites Regulamentadores e Consultivos em Setembro 2004

LIMITES REGULADORES EXISTENTES NA UE			
MICOTOXINA	PRODUTOS	LIMITE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
OCRATOXINA A			
	Grãos de cereal crus	5	
	Cereais e Produtos cerealíferos	3	
	Frutas secadas da videira (uvas, passas, sultanas)	10	
AFLATOXINAS		AFB1	TOTAL
	Nozes e frutos secados e produtos processados para consumo directo humano	2	4
	Amendoins crus ou sujeitos a outros tratamentos físicos prévios ao consumo humano ou uso como um ingrediente em produtos alimentares	8	15
	Nozes e outros frutos secados crus ou sujeitos a outros tratamentos físicos prévios ao consumo humano ou uso como um ingrediente em produtos alimentares	5	10
	Cereais e produtos processados	2	4
	Cereais crus ou sujeitos a outros tratamentos físicos prévios ao consumo humano ou uso como um ingrediente em produtos alimentares	2	4
	Milho crus ou sujeitos a outros tratamentos físicos prévios ao consumo humano ou uso como um ingrediente em produtos alimentares	5	10
	Especiarias <i>Capiscum</i> spp (chillies, pó de chilli, <i>cayenne</i> , páprica), <i>Piper</i> spp (pimenta branca e preta), noz moscada, gengibre, curcuma	5	10
		AFM1	
	Leite e produtos lácteos	0.05 $\mu\text{g}/\text{l}$	
LIMITES CONSULTIVOS NA UE			
MICOTOXINA	PRODUTOS	LIMITE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
OCRATOXINA A			
	grãos de café torrado e produtos com café (excepto café solúvel)	4-5	
	Café instantâneo (solúvel)	8-10	
	Vinho de mesa (tinto/rosé e branco)	2	
	Sumo de uva e sumos contendo >50% sumo de uva	2	
	Sumos conc. e reconstituídos e nectares de fruta	2	
	Mosto de uva	2	
	Fruta secada da videira (*poderá baixar para 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	10*	
	Alimentos para bebés e crianças (material secadry)	0.5	
	Alimentos dietéticos para fins médicos destinados a bebés	0.5	
Baixa prioridade – níveis previsíveis continuam ainda em discussão			
	Café verde	--	
	Outros frutos secos	--	
	Cerveja	--	

	Cacau em pó, produtos de cacau incluindo o chocolate	--	
	Especiarias (páprica, pimenta, noz moscada e gengibre)	--	
	Liquorice	--	
TRICOTECENOS			
Desoxinivalenol	Cereais não processados à excepção do trigo, aveia e milho	1250	
	Trigo e aveia não processado	1750	
	Milho não processado (se nenhum limite específico for definido antes de 1.7.2007)	1750	
	Fariha de cereais, incluindo farinha de milho, semolina, milho <i>grits</i> , milho semolina	750	
	Pão, pastries, biscoitos, <i>snacks</i> de cereal e cereais de pequeno almoço	500	
	Pasta (seca)	750	
	Alimentos derivados de cereais processados para bebés e crianças e <i>baby food</i>	200-250	
T2/HT2 (soma de ambos)			
Os níveis serão ajustados após a geração de mais dados de ocorrência, dados de consulta prévia são aqui incluídos para fins de informação			
	Cereais não processados e produtos cerealíferos (nível máximo até 1.7.2007)	TBA	
PATULINA			
	Sumos de fruta e Bebidas espirituosas	50	
	Produtos sólidos de maçã	25	
	Sumo de maçã para crianças (* 25 se os métodos analíticos não atingirem os 10)	10*	
AFLATOXINAS			
	Alimentos para bebés e cereais processados para bebés e crianças e ingredientes usados no seu fabrico (matéria seca)	0.1	
	<i>Infant formulae</i>		0.025
	Alimentos dietéticos para fins médicos destinados a bebés	0.1	0.025
ZEARALENONA (também referida como ZEA, ZON, F2) (1 Julho 2006)			
	Cereais não processados à excepção do milho	100	
	Milho não processado (se não existir um limite específico até Julho 2007)	200	
	Farinha de cereais excepto farinha de milho	75	
	Farinha de milho, refeições de milho, milho <i>grits</i> e óleo refinado de milho	200	
	Pão, <i>pastries</i> , biscoitos	50	
	<i>snacks</i> de milho e <i>cornflakes</i> (se nenhum limite específico for definido até Julho 2007)	50	
	Outros <i>snacks</i> de cereal e cereais de pequeno almoço	50	
	Alimentos derivados de cereais processados para bebés e crianças	20	
FUMONISINAS (FB1 e FB2) (1 Julho 2007 se nenhum limite específico for definido até esta data)			
	Milho não processado	2000	
	Alimentos derivados do milho para consumo humano directo com excepção dos seguintes	400	
	Grãos (<i>grits</i>) de milho, refeições de milho, farinha de milho e semolina de milho	1000	
	Alimentos derivados de cereais processados para bebés e crianças e <i>baby food</i>	150	

MICOTOXINA	PRODUTOS	LIMITE (Máx. 12% Humidade) (µg/kg)
AFLATOXINA B1 em rações para animais		
	Todas as matérias primas das rações	20
	Rações completas para gado caprino e ovino (excepções abaixo)	20
	Rações completas para animais leiteiros	5
	Rações completas para novilhos e cordeiros	10
	Rações completas para porcos e aves domésticas	20
	Outras rações completas	10
	Rações Complementares	
	Gado caprino e ovino	20
	Animais leiteiros, novilhos e cordeiros	10
	Porcos e aves domésticas	20
	Outros	10

in http://www.rhmtech.co.uk/science/mycotoxin_popup.htm

As informações sobre os limites máximos para as várias micotoxinas nos vários países encontram-se compiladas numa publicação da FAO, com o título “*Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*” - FAO Food and Nutrition Paper 81 - Roma 2004

4.4 LEGISLAÇÃO EXISTENTE

Os procedimentos gerais da Comunidade Europeia em relação aos contaminantes alimentares são estabelecidos pelo [Regulamento \(CEE\) n.º 315/93](#).

Neste Regulamento, entende-se por “contaminante” qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada a um género alimentício mas que nele esteja presente como resíduo da produção (incluindo os tratamentos aplicados às culturas e ao gado e na prática da medicina veterinária), fabrico, processamento, preparação, tratamento, acondicionamento, embalagem, transporte ou armazenagem do referido alimento ou ainda como resultado de contaminação ambiental. (As matérias estranhas tais como, por exemplo, fragmentos de insectos, pêlos de animais e outras matérias não estão abrangidas por esta definição).

Qualquer alimento contendo um contaminante numa quantidade que seja inaceitável do ponto de vista da saúde pública e, em particular, num nível toxicologicamente significativo não deverá ser colocado no mercado. Além disso, os níveis dos contaminantes devem ser mantidos tão baixo quanto seja possível seguindo as boas práticas.

Com o intuito de proteger a saúde pública, o Regulamento (CE) n.º 315/93/CEE providencia que os níveis máximos sejam estabelecidos para determinados contaminantes como parte de uma lista não exaustiva da comunidade.

A introdução do [Regulamento \(CE\) N.º 466/2001](#) e as correspondentes posteriores emendas, estabelecem actualmente os limites máximos para os nitratos, aflatoxinas, metais pesados (chumbo, cádmio, mercúrio), 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD), dioxinas, ocratoxina A, patulina e toxinas de *Fusarium* (desoxinivalenol e outros tricotecenos, zearalenona, fumonisinas). O regulamento faz também a referência aos métodos de amostragem e de análise a ser usados para a sua detecção.

4.4.1 Disposições legais ao nível da UE no que diz respeito às micotoxinas

O Regulamento (CEE) n.º 315/93/CEE do Conselho, de 8 de Fevereiro de 1993, que estabelece os procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos géneros alimentícios (*JO L 037 de 13/02/1993 p. 0001 - 0003*)

O Regulamento (CE) N.º 466/2001 da Comissão, de 8 de Março de 2001 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios (*JO L 077 de 16/03/2001 p. 0001 - 0013*)

Alterado pelos:

- Regulamento (CE) N.º 257/2002 da Comissão de 12 de Fevereiro de 2002 que altera o Regulamento (CE) n.º 194/97 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, e o Regulamento (CE) n.º 466/2001 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios (*J.O. L 41, p. 12, 13.02.2002*)
- Regulamento (CE) N.º 472/2002 da Comissão de 12 de Março de 2002 que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios (*J.O. L 75, p. 18, 16.03.2002*)
- Regulamento (CE) N.º 1425/2003 da Comissão de 11 de Agosto de 2003 que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no respeitante à **patulina** (*J.O. L 203, p. 01, 12.08.2003*)
- Regulamento (CE) N.º 2174/2003 da Comissão de 12 de Dezembro de 2003 que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no respeitante às **aflatoxinas** (*J.O. L 326, p. 12, 13.12.2003*)
- Regulamento (CE) N.º 455/2004 da Comissão de 11 de Março de 2004 que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no respeitante à **patulina** (*J.O. L 74, p. 11, 12.03.2004*)
- Regulamento (CE) N.º 683/2004 da Comissão de 13 de Abril de 2004 que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no que diz respeito às aflatoxinas e à **ocratoxina A** nos alimentos destinados a lactentes e a crianças jovens (*J.O. L 106, p. 03, 15.04.2004*)

- [Regulamento \(CE\) N.º 123/2005](#) da Comissão de 26 de Janeiro de 2005 que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no que diz respeito à *ocratoxina A* (*J.O. L 25*, p. 03, 28.01.2005)
- [Regulamento \(CE\) N.º 856/2005](#) da Comissão de 6 de Junho de 2005 que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001, no que diz respeito às *toxinas Fusarium* (*J.O. L 143*, p. 03, 07.06.2005)

Existe uma versão consolidada do [Regulamento N.º 466/2001/EC](#) a qual inclui apenas as alterações surgidas até ao [Regulamento \(CE\) N.º 208/2005](#) da Comissão de 4 de Fevereiro de 2005 que altera aquele Regulamento no que diz respeito aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (*J.O. L 043 de 08.02.2005, p. 0003-0005*).

A Comissão Europeia publicou recentemente um [Documento de Orientação destinado às Autoridades Competentes para o controlo do cumprimento da Legislação da UE relativa às Aflatoxinas](#) que é evolutivo e será actualizado consoante as informações prestadas ou a experiência das autoridades competentes dos vários Estados-Membros. Tal como o nome indica, trata-se de um documento de orientação que incide principalmente no controlo oficial da contaminação por aflatoxinas de produtos alimentares objecto de medidas de salvaguarda específicas da Comissão. No entanto, as disposições contidas neste documento também se aplicam, quando pertinente, ao controlo das aflatoxinas nos produtos alimentares que não são objecto dessas decisões da Comissão.

4.4.1.1 As medidas de salvaguarda específicas

De acordo com o [Regulamento \(CE\) n.º 178/2002](#) do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios, a Comissão deve suspender a colocação no mercado ou o uso de rações ou géneros alimentícios que possam constituir um sério risco à saúde humana, ou tomar qualquer outra medida provisória apropriada quando tal risco não pode ser satisfatoriamente contido por meio de medidas tomadas pelos Estados Membros interessados.

Nos tempos mais recentes, a Comissão Europeia tem publicado de uma forma crescente, Decisões para dar efeito às medidas de recuperação ou protectoras, em resposta aos alertas alimentares pois constatou-se que os seguintes produtos alimentares se encontravam, em muitos casos, contaminados com níveis excessivos de aflatoxina B1 e de aflatoxina total pelo que as Decisões definem as circunstâncias especiais para a sua importação.

- [DECISÃO da Comissão 2000/49/CE](#), de 6 de Dezembro de 1999, que revoga a Decisão 1999/356/CE e impõe condições especiais à importação de amendoins e de determinados produtos derivados do amendoim, originários ou provenientes do [Egipto](#) (*JO L 19 de 25.1.2000, p. 46*), com a última redacção que lhe foi dada pela [Decisão da Comissão 2004/429/CE](#), de 29 de Abril de 2004, que altera as Decisões 97/830/CE, 2000/49/CE, 2002/79/CE e 2002/80/CE no que respeita aos pontos de entrada através dos quais podem ser importados para a Comunidade Europeia os produtos em causa (*JO L 154 de 30/04/2004 p. 0019 - 0034*) existindo ainda a [Rectificação à Decisão da Comissão 2004/429/CE](#), de 29 de Abril de 2004, que altera as Decisões 97/830/CE, 2000/49/CE, 2002/79/CE e 2002/80/CE no que respeita aos pontos de entrada através dos quais podem ser importados para a Comunidade Europeia os produtos em causa (*JO L 189 de 27/05/2004 p. 0013 - 0026*).

- [DECISÃO da Comissão 2002/79/CE](#), de 4 de Fevereiro de 2002, que impõe condições especiais à importação de amendoins e de determinados produtos derivados do amendoim, originários ou provenientes da [China](#) (*JO L 34 de 5.2.2002, p. 21*), com a última redacção que lhe foi dada pela [Decisão da Comissão 2004/429/CE](#), de 29 de Abril de 2004, que altera as Decisões 97/830/CE, 2000/49/CE, 2002/79/CE e 2002/80/CE no que respeita aos pontos de entrada através dos quais podem ser importados para a Comunidade Europeia os produtos em causa (*JO L 154 de 30/04/2004 p. 0019 - 0034*) existindo também a [Rectificação à Decisão da Comissão 2004/429/CE](#), de 29 de Abril de 2004, que altera as Decisões 97/830/CE, 2000/49/CE, 2002/79/CE e 2002/80/CE no que respeita aos pontos de entrada através dos quais podem ser importados para a Comunidade Europeia os produtos em causa (*JO L 189 de 27/05/2004 p. 0013 - 0026*).

- [DECISÃO da Comissão 2002/80/CE](#), de 4 de Fevereiro de 2002, que impõe condições especiais à importação de figos, avelãs e pistácios e de determinados produtos derivados, originários ou provenientes da [Turquia](#) (*JO L 034 de 05/02/2002 p. 0026 - 0030*), com a última redacção que lhe foi dada pela [Decisão da Comissão 2004/429/CE](#), de 29 de Abril de 2004, que altera as Decisões 97/830/CE, 2000/49/CE, 2002/79/CE e 2002/80/CE no que respeita aos pontos de entrada através dos quais podem ser importados para a Comunidade Europeia os produtos em causa (*JO L 154 de 30/04/2004 p. 0019 - 0034*) existindo também a [Rectificação à Decisão da Comissão 2004/429/CE](#), de 29 de Abril de 2004, que altera as Decisões 97/830/CE, 2000/49/CE, 2002/79/CE e 2002/80/CE no que respeita aos pontos de entrada através dos quais podem ser importados para a Comunidade Europeia os produtos em causa (*JO L 189 de 27/05/2004 p. 0013 - 0026*)

- [DECISÃO da Comissão 2003/493/CE](#), de 4 de Julho de 2003, que impõe condições especiais à importação de castanhas-do-Brasil com casca, originárias ou provenientes do Brasil (*JO L 168 de 05/07/2003 p. 0033 - 0038*), com a última redacção que lhe foi dada pela [Decisão da Comissão 2004/428/CE](#), de 29 de Abril de 2004, que altera a Decisão 2003/493/CE no que respeita aos pontos de entrada através dos quais podem ser importadas para a Comunidade Europeia castanhas do Brasil com casca, originárias ou provenientes do Brasil (*JO L 154 de 30/04/2004 p. 0014 - 0018*) existindo uma [Rectificação à Decisão da Comissão 2004/428/CE](#), de 29 de Abril de 2004, que altera a Decisão 2003/493/CE no que respeita aos pontos de entrada através dos quais podem ser importadas para a Comunidade Europeia castanhas do Brasil com casca, originárias ou provenientes do Brasil (*JO L 189 de 27/05/2004 p. 0008 - 0012*)

- [DECISÃO da Comissão 2005/85/CE](#), de 26 de Janeiro de 2005, que impõe condições especiais à importação de pistácios e de determinados produtos derivados dos pistácios originários ou provenientes do [Irão](#) (*JO L 030 de 03/02/2005 p. 0012 - 0018*)

A seguir faz-se uma pequena resenha do que existe em termos de legislação comunitária por micotoxina.

Aflatoxinas

Com base no Regulamento (CEE) n.º 315/93 do Conselho e na [Directiva 85/591/CE](#) do Conselho, os níveis máximos para [aflatoxinas](#) em determinados géneros alimentícios foram ajustados pelo Regulamento (CE) n.º 194/97 da Comissão alterado então pelo [Regulamento \(CE\) n.º 1525/98](#) da Comissão.

Como atrás referido, o [Regulamento \(CE\) N.º 466/2001](#) da Comissão, de 8 de Março de 2001 fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios (*JO L 077 de 16/03/2001 p. 0001 - 0013*)

Tendo sido já alterado pelos:

- [Regulamento \(CE\) N.º 257/2002](#)
- [Regulamento \(CE\) N.º 472/2002](#)
- [Regulamento \(CE\) N.º 2174/2003](#)
- [Regulamento \(CE\) N.º 683/2004](#)

Amostragem/Método de Análise:

A [Directiva 98/53/CE](#) da Comissão de 16 de Julho de 1998 que fixa os métodos de colheita de amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes nos géneros alimentícios (*JO L 201 de 17/07/1998 p. 0093 - 0101*)

Alterada pelas:

- [Directiva 2002/27/CE](#) da Comissão de 13 de Março de 2002 que altera a Directiva 98/53/CE, que fixa os métodos de colheita de amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes nos géneros alimentícios (*JO L 75 de 16/03/2002 p. 0044 - 0045*)
- [Directiva 2003/121/CE](#) da Comissão, de 15 de Dezembro de 2003, que altera a Directiva 98/53/CE que fixa os métodos de colheita de amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes nos géneros alimentícios (*JO L 332 de 19/12/2003 p. 0038 – 0040*)
- [Directiva 2004/43/CE](#) da Comissão, de 13 de Abril de 2004, que altera a Directiva 98/53/CE e a Directiva 2002/26/CE no que diz respeito aos métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial dos teores de [aflatoxina](#) e de [ocratoxina A](#) nos géneros alimentícios destinados a lactentes e crianças jovens (*JO L 113 de 20/04/2004 p. 0014 – 0016*)

Ocratoxina A

O Regulamento (CE) N.º 466/2001 da Comissão foi válido até Abril 2002, quando o regulamento (CE) n.º 194/97 da Comissão o revogou. Durante este período, os níveis máximos para o ocratoxina A foram ajustados pelo Regulamento (CE) n.º 472/2002 da Comissão e os métodos de amostragem foram regulados pelas Directivas 2002/26/CE e 2002/27/CE.

Alterado pelos:

- Regulamento (CE) N.º 472/2002
- Regulamento (CE) N.º 683/2004
- Regulamento (CE) N.º 123/2005

Amostragem/Método de Análise:

A Directiva 2002/26/CE da Comissão de 13 de Março de 2002 fixa os métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial do teor de ocratoxina A nos géneros alimentícios (*JO L 75 de 16/03/2002 p. 0038 - 0043*)

Alterada pela

- Directiva 2005/5/CE da Comissão de 26 de Janeiro de 2005 que altera a Directiva 2002/26/CE no que respeita aos métodos de colheita de amostras e aos métodos de análise para o controlo oficial dos teores de ocratoxina A nos géneros alimentícios (*JO L 27 de 29/01/2005 p. 0038 - 0040*)

O limite máximo para a OTA em cereais e produtos derivados, em amendoins, frutos de casca rija e frutos secos foi estabelecido pelo Regulamento (CE) N.º 466/2001. O Regulamento (CE) N.º 683/2004 estabelece os limites máximos aplicáveis a alimentos para bebés e alimentos à base de cereais destinados a lactentes e crianças jovens (conforme definido no Artigo 1º da Directiva 96/5/CE da Comissão, de 16 de Fevereiro de 1996, relativa aos alimentos à base de cereais e aos alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças (*JO L 049 de 28/02/1996 p. 0017 – 0028*) e também a alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos, especificamente destinados a bebés (como definido no n.º 2 do Artigo 1º da Directiva 1999/21/CE da Comissão, de 25 de Março de 1999 relativa aos alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos). Este Regulamento não se aplica a produtos que tenham sido colocados no mercado antes de 1 de Novembro de 2004, em conformidade com as disposições aplicáveis.

O [Regulamento \(CE\) N.º 123/2005](#) da Comissão, de 26 de Janeiro de 2005 que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no que diz respeito à [ocratoxina A](#) (*JO L 25 de 28/01/2005 p. 0003 - 0005*) estabelece os limites máximos de no café torrado, moído e em grão, vinho (tinto, branco e rosé) e outro vinho e/ou bebidas à base de mosto de uvas, sumo de uva, ingredientes de sumo de uva noutras bebidas incluindo néctar de uva e concentrado de uva reconstituído. Este regulamento não se aplica a produtos que tenham sido colocados no mercado antes de 1 de Abril de 2005 em conformidade com as disposições aplicáveis.

Patulina

O [Regulamento \(CE\) N.º 466/2001](#)

Alterado pelos:

- [Regulamento \(CE\) N.º 1425/2003](#)
- [Regulamento \(CE\) N.º 455/2004](#)

Método de Análise:

[Directiva 2003/78/CE](#) da Comissão de 11 de Agosto de 2003 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial do teor de patulina nos géneros alimentícios (*JO L 203 de 12/08/2003 p. 0040 - 0044*)

Recomendações da Comissão:

- [Recomendação da Comissão](#) (2003/598/CE) de 11 de Agosto de 2003 relativa à prevenção e redução da contaminação por patulina do sumo de maçã e dos ingredientes do sumo de maçã noutras bebidas (*JO L 203 de 12/08/2003 p. 0054 - 0059*).

Pelo [Regulamento \(CE\) N.º 1425/2003](#) são estabelecidos os níveis máximos para a patulina em sumos de fruta, em especial o sumo de maçã e o sumo de fruta usado como ingrediente noutras bebidas, incluindo o néctar de fruta, bebidas espirituosas, sidra e outras bebidas fermentadas derivadas de maçãs ou contendo sumo de maçã, produtos sólidos de maçã, incluindo compota e puré de maçã para consumo directo e compota e puré de maçã destinado a lactentes e crianças jovens.

A [Recomendação da Comissão \(2003/598/CE\)](#) sugere que se adoptem as medidas necessárias para garantir que o “Código de Prática para a prevenção e redução da contaminação por patulina do sumo de maçã e dos ingredientes do sumo de maçã noutras bebidas”, descrito no seu anexo, seja implementado por todos os operadores da indústria de transformação de maçã. As recomendações contidas neste código para a redução da contaminação por patulina no sumo de maçã estão divididas em duas partes:

- I. Práticas recomendadas com base em Boas Práticas Agrícolas (BPA).
- II. Práticas recomendadas com base em Boas Práticas de Fabrico (BPF).

Toxinas de *Fusarium*

O [Regulamento \(CE\) N.º 466/2001](#)

Alterado pelo:

- [Regulamento \(CE\) N.º 856/2005](#) altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001, no que diz respeito às toxinas *Fusarium*.

Método de Análise:

[Directiva 2005/38/CE](#) da Comissão de 6 de Junho de 2005 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de *toxinas Fusarium* nos géneros alimentícios (*JO L 143 de 07/06/2005 p. 0018 - 0026*).

No [Regulamento \(CE\) N.º 856/2005](#) são fixados os teores máximos tendo em conta a exposição humana actual em relação à dose diária admissível da toxina em questão e à possibilidade destes poderem ser razoavelmente alcançados respeitando as boas práticas em todas as fases de produção e distribuição.

Tal abordagem garante que os operadores das empresas do sector alimentar apliquem todas as medidas possíveis para evitar e ou reduzir a contaminação tanto quanto possível, de modo a proteger a saúde pública. Além deste conjunto de diplomas comunitários, existem também algumas leis nacionais e alguns regulamentos próprios dos Estados-Membros que cobrem os géneros alimentícios não regulados pela legislação Europeia.

Entretanto têm sido elaboradas algumas recomendações com o objectivo de ir diminuindo a quantidade de algumas micotoxinas nos géneros alimentícios principalmente nos que se destinam a uma população mais sensível e susceptível, como sejam os bebés e lactentes.

Em jeito de conclusão quanto a esta temática dos limites máximos recomendados e consolidados, pode-se dizer que o reconhecimento do facto das micotoxinas poderem causar efeitos adversos sérios ao Homem e aos animais, fez com que muitos países estabelecessem regulamentos que limitam a presença destes resíduos nos alimentos e nas rações.

Até à data, existem mais de 100 países no Mundo que têm limites específicos para algumas micotoxinas presentes nos géneros alimentícios e nas rações. A população total nestes países representa aproximadamente 90% dos habitantes do Mundo pelo que a maioria estará em princípio protegida dos seus malefícios.

Na UE, nos tempos que se avizinham, prevê-se uma expansão adicional significativa dos regulamentos harmonizados para as micotoxinas em alimentos e rações, e com os avanços ao nível da metodologia e equipamentos laboratoriais, os limites actuais de algumas micotoxinas serão diminuídos.

4.5 Quadro (cronológico) da Legislação Comunitária e Nacional

4.5.1 Legislação Comunitária

(1)	Sétima Directiva 76/372/CEE	fixa os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais.
(2)	Directiva 83/228/CEE	fixa as linhas directrizes para a avaliação de certos produtos utilizados na alimentação dos animais
(3)	Directiva 87/153/CEE alterada pela (5)	fixa linhas directrizes para a avaliação dos aditivos na alimentação para animais
(4)	Regulamento (CEE) n.º 315/93	estabelece os procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos géneros alimentícios
(5)	Directiva 94/40/CE	<u>altera</u> os anexos da Directiva 87/153/CEE fixa linhas directrizes para a avaliação dos aditivos na alimentação para animais
(6)	Directiva 96/23/CE	relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos <u>revoga</u> as Directivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE.
(7)	Regulamento (CE) n.º 194/97 alterado pelo (9) e (14) revogado	fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios
(8)	Decisão da Comissão (97/747/CE)	fixa o nível e a frequência de amostragem previstos pela Directiva 96/23/CE do Conselho para a pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos em certos produtos de origem animal.
(9)	Regulamento (CE) n.º 1525/98	<u>altera</u> o Regulamento (CE) n.º 194/97 fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios
(10)	Directiva 98/53/CE alterada pela (17) e (25)	fixa os métodos de colheita de amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes nos géneros alimentícios
(11)	Regulamento (CE) n.º 1566/1999	<u>altera</u> o Regulamento (CE) n.º 194/97 fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios
(12)	Regulamento (CE) n.º 466/2001 alterado pelo (14), (15), (19), (20), (23), (24) e (28)	fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios
(13)	Recomendação da Comissão (2002/214/CE)	relativa aos programas coordenados de controlo no domínio da alimentação animal para 2002, nos termos da Directiva 95/53/CE
(14)	Regulamento (CE) n.º 257/2002	<u>altera</u> o Regulamento (CE) n.º 194/97 e o Regulamento (CE) n.º 466/2001

(15)	Regulamento (CE) n.º 472/2002	altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.
(16)	Directiva 2002/26/CE alterada pela (25) e (26)	fixa os métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial do teor de ocratoxina A nos géneros alimentícios
(17)	Directiva 2002/27/CE	altera a Directiva 98/53/CE fixa os métodos de colheita de amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes nos géneros alimentícios
(18)	Decisão do Conselho (2002/836/CE)	adopta o programa específico de investigação, desenvolvimento tecnológico e demonstração a executar por meio de acções directas pelo Centro Comum de Investigação (2002-2006)
(19)	Regulamento (CE) n.º 1425/2003	altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no respeitante à patulina
(20)	Regulamento (CE) n.º 2174/2003	altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no respeitante às aflatoxinas
(21)	Directiva 2003/78/CE	estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial do teor de patulina nos géneros alimentícios.
(22)	Recomendação da Comissão (2004/163/CE)	relativa ao programa coordenado de controlo no domínio da alimentação animal para 2004, nos termos da Directiva 95/53/CE do Conselho
(23)	Regulamento (CE) n.º 455/2004	altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no respeitante à patulina .
(24)	Regulamento (CE) n.º 683/2004	altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no que diz respeito às aflatoxinas e à ocratoxina A nos alimentos destinados a lactentes e a crianças jovens.
(25)	Directiva 2004/43/CE	altera a Directiva 98/53/CE e a Directiva 2002/26/CE no que diz respeito aos métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial dos teores de aflatoxina e de ocratoxina A nos géneros alimentícios destinados a lactentes e crianças jovens.
(26)	Directiva 2005/5/CE	altera a Directiva 2002/26/CE no que respeita aos métodos de colheita de amostras e aos métodos de análise para o controlo oficial dos teores de ocratoxina A nos géneros alimentícios
(27)	Directiva 2005/38/CE	estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de toxinas de <i>Fusarium</i> nos géneros alimentícios.
(28)	Regulamento (CE) n.º 856/2005	altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001, no que diz respeito às toxinas <i>Fusarium</i>

4.5.2 Legislação Nacional

(1)	Decreto-Lei n.º 72-I/2003	Altera o Decreto-Lei n.º 110/2001, de 6 de Abril, transpondo para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 2002/27/CE, da Comissão, de 13 de Março, que altera a Directiva n.º 98/53/CE, da Comissão, de 16 de Julho, que fixa os métodos de colheita de amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes nos géneros alimentícios
(2)	Decreto-Lei n.º 110/2001 alterado	Transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 98/53/CE, da Comissão, de 16 de Julho, relativa à aproximação das legislações dos Estados membros sobre os métodos de colheitas e amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes (aflatoxinas) nos géneros alimentícios
(3)	Decreto-Lei n.º 148/99	Transpõe para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 96/23/CE, do Conselho, de 29 de Abril, relativa às medidas de controlo a aplicar a certos subprodutos e aos seus resíduos em animais vivos e respectivos produtos
(4)	Portaria n.º 69/97	Revoga a Portaria n.º 1104/89 Aprova as linhas directrizes para a avaliação dos aditivos na alimentação para animais.
(5)	Portaria n.º 62/97	Altera o anexo I da Portaria n.º 1107/89, de 27 de Dezembro, com a redacção que lhe foi introduzida pela Portaria n.º 1208/91, de 19 de Dezembro
(6)	Portaria n.º 16/97	Aprova o método oficial de análise a utilizar para a determinação do teor de aflatoxina B nos alimentos para animais
(7)	Portaria n.º 1208/91	Altera o anexo I da Portaria n.º 1107/89 Aprova a lista de substâncias e produtos indesejáveis nos alimentos simples, matérias-primas e alimentos compostos destinados à alimentação animal e respectivos teores máximos admissíveis
(8)	Portaria n.º 1107/89 alterada	Aprova a lista de substâncias e produtos indesejáveis nos alimentos e respectivos teores máximos admissíveis
(9)	Portaria n.º 1104/89 revogada	Estabelece as linhas directrizes para a avaliação dos aditivos destinados à alimentação animal
(10)	Decreto-Lei n.º 6/83	Estabelece os limites máximos de aflatoxinas nos alimentos para consumo humano
(11)	Portaria n.º 671/73	Fixa os limites máximos de aflatoxinas permitidas nos alimentos simples e compostos utilizados como ração de animais

5 BIBLIOGRAFIA E ANEXOS

5.1 PUBLICAÇÕES

- Abbas, H.K., Cartwright, R.D., Xie, W. and Shier, W.T. (2006). Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Protection*, **25**: 1-9
- Aboul-Enein, H.Y., Kutluk, Ö. B., Altiokka, G. and Tunçel, M. (2002). A modified HPLC method for the determination of ochratoxin A by fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, **16**: 470-474
- Alarcon, S.H., Micheli, L., Pallechi, G., Compagnone, D. (2004). Development of an electrochemical immunosensor for ochratoxin A. *Analytical letters*, vol. 37 (8): 1545-1558
- Alborzi, S., Pourabbas, B., Rashidi, M. and Astaneh, B. (2006). Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Shiraz (south of Iran). *Food Control*, **17**: 582-584
- Alexopoulos, C. (2001). Association of *Fusarium* micotoxins with failure in applying an induction of parturition program with PGF2 alpha and oxytocin in sows. *Theriogenology*, **55**: 1745-1757
- Ali, N., Hashim, N.H., Saad, B., Safan, K., Nakajima, M., Yoshizawa, T. (2005). Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonésia. *Food and Chemical Toxicology*, Volume **43** (12): 1763-1772
- Amado, M.A. (1999). Aflatoxinas: Um Problema Mundial. in <http://www.ipv.pt/millennium/16-spec6.htm>
- Amado, M.A. (2002). Métodos Imunológicos na detecção e determinação de Aflatoxinas em alimentos: Vantagens e Inconvenientes. in http://www.ipv.pt/millennium/Millennium26/26_21.htm
- Amalfitano, C., Pengue, R., Andolfi, A., Vurro, M., Zonno, M.C. and Evidente, A. (2002). HPLC Analysis of Fusaric Acid, 9,10-Dehydrofusaric Acid and their Methyl Esters, Toxic Metabolites from Weed Pathogenic *Fusarium* Species. *Phytochemical Analysis*, **13**: 277-282
- Amaral, K.A.S., Nascimento, G.B., Sekiyama, B.L., Janeiro, V., Machinski Jr., M. (2006). Aflatoxins in corn-based food products traded in Brazil and risks to human health [Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana]. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, Volume **26** (2): 336-342
- Anadón, A., Céspedes, A., Caballero, V., Martínez-Larrañaga, M.R. and Martínez, M.A. (2005). Mycotoxins of major impact in pig production and human health implications. *Av. Tecnol. porc.*, **2** (5): 33- 60
- Aparecida, S., Mossini, G., Oliveira, K.P. and Kimmelmeier, C. (2004). Inhibition of patulin production by *Penicillium expansum* cultured with neem *Azadirachta indica* leaf extracts. *J Basic Microbiol.*, **44** (2): 106-113
- Avantaggiato, G., Havenaar, R. and Visconti, A. (2003). Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Food and Chemical Toxicology*, **41**: 1283-1290
- Avantaggiato, G., Havenaar, R. and Visconti, A. (2004). Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food and Chemical Toxicology*, **42**: 817-824

- Axberg, K., Jansson, G. and Hult, K. (1998). Ochratoxin A in Rice Cultivars after Inoculation of *Penicillium verrucosum*. *Natural Toxins*, **6**: 73-84
- Baggiani, C., Giraudi, G. and Vanni, A. (2002). A molecular imprinted polymer with recognition properties towards the carcinogenic mycotoxin ochratoxin A. *Bioseparation*, **10**: 389-394
- Barna-Vetró, I., Solti, L., Téren, J., Gyöngyösi, Á., Szabó, E., Wolfling, A. (1996). Sensitive ELISA Test for determination of Ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 44 (12): 4071-4074
- Bayman, P., Baker, J.L. and Mahoney, N.E. (2002). *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia*, **155**: 161-169
- Bayman, P., Baker, J.L., Doster, M.A., Michailides, T.J. and Mahoney, N.E. (2002). Ochratoxin Production by the *Aspergillus ochraceus* Group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, n.º 5, pp. 2326-2329
- Bennett, J.W. and Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 16, n.º 3, pp. 497-516
- Berente, B., Móricz, A., H-Otta, K., Záray, G., Lékó, L., Rácz, L. (2005). Determination of ochratoxin A in Hungarian wines. *Microchemical Journal*, Volume 79 (1-2): 103-107
- Berg, T. (2003). How to establish international limits for mycotoxins in food and feed? *Food Control*, **14**: 219-224
- Berger, K.J. and Guss, D.A. (2005). Mycotoxins Revisited: Part I. *The Journal of Emergency Medicine*, Vol. 28, n.º 1, pp. 53-62
- Berger, K.J. and Guss, D.A. (2005). Mycotoxins Revisited: Part II. *The Journal of Emergency Medicine*, Vol. 28, n.º 2, pp. 175-183
- Berger, U., Oehme, M., Kuhn, F. (1999). Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B- trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. *J Agric Food Chem.*, **47** (10): 4240-4245
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G., Krska, R. (2005). Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1062** (2): 209-216
- Biancardi, A., Gasparini, M., Dall'Asta, C., Marchelli, R. (2005). A rapid multiresidual determination of type A and type B trichothecenes in wheat flour by HPLC-ESI-MS. *Food Addit Contam.*, **22** (3): 251-258
- Biancardi, A. (1997). Determination of aflatoxin M1 residues in milk: A comparative assessment of ELISA and IAC-HPLC methods. *Industrie Alimentari*, **36**: 870-876
- Biselli, Sc., Hartig, L., Wegner, H. and Hummert, C. (2005). Analysis of *Fusarium* Toxins Using LC-MS-MS: Application to Various Food and Feed Matrices. *Spectroscopy*, **20** (2): 20-32
- Blesa, J., Berrada, H., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Maes, J. (2004a). Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. *J Chromatogr A*, **1046** (1-2): 127-131
- Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2004b). Absence Ochratoxin A in soy sauce. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 97 (2): 221-225
- Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Marín, R. and Mañes, J. (2003). Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. *J Chromatogr A*, **1011**: 49-54

- Boonzaaijer, G., Bobeldijk, I. and van Osenbruggen, W.A. (2005). Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method. *Food Control*, **16**: 587-591
- Bruinink, A., Rasonyi, T. and Sidler, C. (1998). Differences in Neurotoxic Effects of Ochratoxin A, Ochracin and Ochratoxin- α In Vitro. Research Article. *Natural Toxins*, **6**: 173-177
- Burdaspal, P., Legarda, T.M., Gilbert, J. (2001). Determination of ochratoxin A in baby food by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study. *JAOAC Int.*, **84** (5): 1445-1452
- Caldas, E.D., Silva, S.C. e Oliveira, J.N. (2002). Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Rev. Saúde Pública*, **36** (3): 319-323
- Caloni, F., Spotti, M., Auerbach, H., Op den Camp, H., Gremmels, J.F. and Pompa, G., (2000). In vitro metabolism of fumonisin B1 by ruminal microflora. *Veterinary Research Communications*, **24**: 379-387
- Camargos, S.M., Soares, L.M.V., Sawazaki, E., Bolonhezi, D., Castro, J.L. and Bortolletto, N. (2001). Accumulation of fumonisins B1 and B2 in freshly harvested Brazilian commercial maize at three locations during two nonconsecutive seasons. *Mycopathologia*, **155**: 219-228
- Cantalejo, M.J., Torondel, P., Amate, L., Carrasco, J.M. and Hernández, E. (1999). Detection of fusarin C and trichothecenes in *Fusarium* strains from Spain. *J Basic Microbiol.*, **39** (3): 143-153
- Carrilho, L. (2003). Micotoxinas. *Microbiologia Agrícola*, Capítulo 6: 1-7
- Cassel, E.K., Barao, S.M. and Carmel, D.K. (1989). Aflatoxicosis and Ruminants. University of Maryland. in <http://www.agnr.umd.edu/MCE/Publications/PDFs/FS507.pdf>
- Cassel, E.K., Campbell, B., Draper, M. and Epperson, B. (2001). Aflatoxins Hazards in Grain / Aflatoxicosis and Livestock. South Dakota State University. in <http://agbiopubs.sdstate.edu/articles/FS907.pdf>
- Cheraghali, A.M., Mohammadi, H.R., Amirahmadi, M., Yazdanpanah, H., Abouhossain, G., Zamanian, F., Khansari, M.G. and Afshar, M. (2004). Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. *Food Control*, **16**: 165-167
- Chiavaro, E., Cacchioli, C., Berni, E., Spotti, E. (2005). Immunoaffinity clean-up and direct fluorescence measurement of aflatoxins B1 and M1 in pig liver: Comparison with high-performance liquid chromatography determination. *Food Addit. Contam.*, **22** (11): 1154-1161
- Chiavaro, E., Dall'Asta, C., Galaverna, G., Biancardi, A., Gambarelli, E., Dossena, A. and Marchelli, R. (2001). New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *J Chromatogr A*, **937**: 31-40
- Conková, E., Laciaková, A., Kovác, G. and Seidel, H. (2003). Fusarial Toxins and their Role in Animal Diseases. Review. *The Veterinary Journal*, **165**: 214-220
- Creppy, E.E., Chiarappa, P., Baudrimont, I., Borracci, P., Moukhaa, S. and Carratù, M. R. (2004). Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? *Toxicology*, **201**: 115-123
- Curtui, V., Usleber, E., Dietrich, R., Lepschy, J. and Märthlbauer, E. (1998). A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. *Mycopathologia*, **143**: 97-103

- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Dossena, A. and Marchelli, R. (2004). Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of **ochratoxin A** in wine. *J Chromatogr A*, **1024**: 275-279
- Dänicke, S., Valenta, H., Döll, S., Ganter, M. and Flachowsky, G. (2004). On the effectiveness of a detoxifying agent in preventing **fusario-toxicosis** in fattening pigs. *Animal Feed Science and Technology*, **114**: 141-157
- Dao, H.P., Mathieu, F. and Lebrihi, A. (2005). Two primer pairs to detect **OTA** producers by PCR method. *International Journal of Food Microbiology*, **104**: 61-67
- Delage, N., d'Harlingue, A., Ceccaldi, B. Colonna, Bompeix, G. (2003). Occurrence of **mycotoxins** in fruit juices and wine. *Food Control*, **14**: 225-227
- Delgadillo, I. (1986). Simultaneous quantitative determination of secondary metabolites of *Aspergillus ochraceus* by TLC. *Mycotoxin Research*, Vol. 2: 65-69
- Delgadillo, I. (2003) "São as **micotoxinas** realmente perigosas?" Actas do 6º Encontro de Química de Alimentos. IPIMAR, Lisboa, Portugal, pp. 597-606
- Delgadillo, I. e Nunes, A. (1997) **Micotoxinas**. Terra Fértil, nº 3 - Revista da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu, **3**: 46-49
- Delmulle, B.S., De Saeger, S.M.D.G., Sibanda, L., Barna-Vetro, I. and Van Peteghem, C.H. (2005). Development of an Immunoassay-Based Lateral Flow Dipstick for the Rapid Detection of **Aflatoxin B1** in Pig Feed. *J Agric Food Chem.*, **53** (9): 3364-3368
- Demyttenaere, J.C.R., Moriña, R.M., De Kimpe, N. and Sandra, P. (2004). Use of headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction for the detection of the volatile metabolites produced by toxigenic *Fusarium* species. *J Chromatogr A*, **1027**: 147-154
- Dilkin, P., Hasegawa, R., Alves dos Reis, T., Mallmann, C.A. e Corrêa, B. (2004). Intoxicação experimental de suínos por **fumonisin**s. *Ciência Rural*, Santa Maria, Vol. 34, nº 1, p.175-181
- Dilkin, P., Zorzete, P., Mallmann, C.A., Gomes, J.D.F., Utiyama, C.E., Oetting, L. L. and Corrêa, B. (2003). Toxicological effects of chronic low doses of **aflatoxin B1** and **fumonisin B1**-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. *Food and Chemical Toxicology*, **41**: 1345-1353
- D'Ovidio, K., Trucksess, M., Weaver, C., Horn, E., McIntosh, M., Bean, G. (2006). **Aflatoxins** in ginseng roots. *Food Addit. Contam.*, **23** (2): 174-180
- Doyle, M.E. *Fusarium Mycotoxins*, first published **December 1997**, Food Research Institute, UW-Madison, FRI Briefings. in <http://www.wisc.edu/fri/fusarium.htm>
- Dragacci, S., Grosso, F., Gilbert, J. (2001). Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk. *J AOAC Int.*, **82** (2): 437-443
- Duncan, K., Kruger, S., Zabe, N., Kohn, B. and Prioli, R. (1998). Improved fluorometric and chromatographic methods for the quantification of **fumonisin B1, B2 and B3**. *J Chromatogr A*, **815**: 41-47
- Dutton, M.F. (1996) **Fumonisin**s, Mycotoxins of increasing importance: Their Nature and Their Effects. *Pharmacol. Ther.*, Vol. 70, nº 2: 137-161
- Eke, Z., Torkos, K. (2004). N,N-dimethyl-trimethylsilyl-carbamate as a derivatizing agent in gas chromatography of **trichothecene** mycotoxins. *Microchemical Journal*, Volume 77 (1): 43-46

- El Adlouni, C., Tozlovanu, M., Naman, F., Faid, M., Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives “Greek style” of Moroccan origin. *Molecular Nutrition & Food Research*, Volume 50 (6): 507-512
- El-Sayed, A.M.A.A., Soher, E.A. and Sahab, A.F. (2003). Occurrence of certain mycotoxins in corn and corn-based products and thermostability of fumonisin B1 during processing. *Nahrung/Food*, 47, n.º 4: 222-225
- Entwisle, A.C., Williams, A.C., Mann, P.J., Russell, J., Slack, P.T. and Gilbert, J. (2001). Combined phenyl silane and immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: Collaborative study. *JAOAC Int.*, 84 (2): 444-450
- Entwisle, A.C., Williams, A.C., Mann, P.J., Slack, P.T., Gilbert, J. (2000). Liquid chromatographic method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley: Collaborative study. *JAOAC Int.*, 83 (6): 1377-1386
- Eriksen, G.S. and Pettersson, H. (2003). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114: 205-239
- Faberi, A., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R. and Laganà, A. (2005). Determination of type B fumonisin mycotoxins in maize and maize-based products by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry using a QqQlinear ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19: 275-282
- Fandohan, P., Hell, K., Marasas, W.F.O. and Wingfield, M.J. (2003). Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. Review. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 2 (12): 570-579. in <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Fazekas, B., Tar, A. (2001). Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography. *JAOAC Int.*, 84 (5): 1453-1459
- Fernández-Treveje, E.O., Verdés, J.A.A. y Espinosa, R.S. (2001). Validación de un método para la determinación de patulina en jugos y purés de frutas por HPLC. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.*, 15 (1): 20-25
- Filali, A., Ouammi, L., Betbeder, A.M., Baudrimont, I., Soulaymani, R., Benayada, A., Creppy, E.E. (2001). Ochratoxin A in beverages from Morocco: A preliminary survey. *Food Addit. Contam.* 18 (6): 565-568
- Fink-Gremmels, J., Jahn, A., Blom, M.J. (1995). Toxicity and metabolism of ochratoxin A. *Natural Toxins*, Volume 3 (4): 214-220
- Freire, F.C.O., Kozakiewicz, Z. and Paterson, R.R.M. (2000). Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, 149: 13-19
- Fremy, J.M. and Chu, F.S. (1989). Immunochemical methods of analysis for aflatoxin M1. in van Egmond, H. P., (ed.), *Mycotoxins in Dairy Products*, London, Elsevier Applied Science, 97-125
- Fungaro, M.H.P., Vissotto, P.C., Sartori, D., Vilas-Boas, L.A., Furlaneto, M.C. and Taniwaki, M. H. (2004). A Molecular Method for Detection of *Aspergillus carbonarius* in Coffee Beans. *Current Microbiology*, 49: 123-127
- García-Villanova, R.J., Cerdón, C., Paramás, A.M.G., Aparicio, P. and Rosales, M.E.G. (2004). Simultaneous Immunoaffinity Column Cleanup and HPLC Analysis of Aflatoxins and Ochratoxin A in Spanish Bee Pollen. *J Agric Food Chem.*, 52: 7235-7239

- Garda, J., Macedo, R. M., Faria, R., Bernd, L., Dors, G. C. and Badiale-Furlong, E. (2005). Alcoholic fermentation effects on malt spiked with [trichothecenes](#). *Food Control*, **16**: 423-428
- Gennari, A., Pazos, P., Boveri, M., Callaghan, R., Casado, J., Maurici, D., Corsini, E. and Prieto, P. (2004). New Insights into the Mechanisms Involved in Renal Proximal Tubular Damage Induced In Vitro by [Ochratoxin A](#). *J Biochem Molecular Toxicology*, **18**, n.º 1: 43-49
- Gilbert, J. (1999). Quality assurance in [mycotoxin](#) analysis. *FNA/ANA*, **23**: 33-37
- Gilbert, J. (2000). Overview of [Mycotoxin](#) Methods, Present Status and Future Needs. Research Article. *Natural Toxins*, **7**: 347-352
- Gilbert, J., Anklam, E. (2002). Validation of analytical methods for determining [mycotoxins](#) in foodstuffs. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, Volume 21 (6-7): 468-486
- Gimeno A. (1979). Thin layer chromatographic determination of [aflatoxins](#), [ochratoxins](#), [sterigmatocystin](#), [zearalenone](#), [citrinin](#), [T-2 toxin](#), [diacetoxyscirpenol](#), [penicillic acid](#), [patulin](#), and [penitrem A](#). *J AOAC Int.*, **62** (3): 579-85
- Göbel R, Lusky K. (2004). Simultaneous determination of [aflatoxins](#), [ochratoxin A](#) and [zearalenone](#) in grains by new immunoaffinity column/liquid chromatography. *J AOAC Int.*, **87** (2): 411-416
- Gökmen, V., Acar, J. and Sarioglu, K. (2005). Liquid chromatographic method for the determination of [patulin](#) in apple juice using solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, **543**: 64-69
- Gómez-Catalán, J., Piqué, E., Falcó, G., Borrego, N., Rodamilans, M. and Llobet, J. M. (2005). Determination of [Aflatoxins](#) in Medicinal Herbs by HPLC. An Efficient Method for Routine Analysis. *Phytochemical Analysis*, **16**: 196-204
- Gonçalves, E., Pinto, M. M. e Felício, J. D. (2001). Análise de [micotoxinas](#) no Instituto Biológico de 1989 a 1999. *Biológico*, São Paulo, Vol. 63, n.º 1/2, p.15-19
- González-Peñas, E., Leache, C., López de Cerain, A. and Lizarraga, E. (2006). Comparison between capillary electrophoresis and HPLC-FL for [ochratoxin A](#) quantification in wine. *Food Chemistry*, **97**: 349-354
- González-Peñas, E., Leache, C., Viscarret, M., Pérez de Obanos, A., Araguás, C. and López de Cerain, A. (2004). Determination of [ochratoxin A](#) in wine using liquid-phase microextraction combined with chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A*, **1025**: 163-168
- Goto, T., Matsui, M. and Kitsuwu, T. (1988). Determination of [Aflatoxins](#) by Capillary Column Gas Chromatography. *J Chromatogr A*, **447** (2): 410-414
- Guillamont, E.M., Lino, C.M., Baeta, M.L., Pena, A.S., Silveira, M.I.N., Vinuesa, J.M. (2005). A comparative study of extraction apparatus in HPLC analysis of [ochratoxin A](#) in muscle. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Volume **383** (4): 570-575
- Gül, N., Özsoy, N., Osmanagaoglu, Ö., Selmanoglu, G. and Koçkaya, E.A. (2005). Effects of [patulin](#) on thymus capillary of rats. *Cell Biochemistry and Function*, **24** (6): 541-546
- Guzmán-de-Peña, Doralinda (2001). Mitos y realidades de las [aflatoxinas](#). *Avance y Perspectiva*, Vol. 20 (Nov.-Dec. 2001): 415-420
- Halt, M. (1998). Moulds and [mycotoxins](#) in herb tea and medicinal plants. *European Journal of Epidemiology*, **14**: 269-274

- Hansen, T.J. (1993). Quantitative testing for **mycotoxin**. *J. American Ass. Cereal Chem.*, **38** (5): 346-348
- Hartl, M., Herderich, M. and Humpf, H.-U. (1999). Rapid determination of **fumonisin FB1** in corn products by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Eur Food Res Technol.*, **209**: 348-351
- Harvey, R.B., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Elissalde, M.H., Casper, H.H., Rottinghaus, G.E. and Turk, J.R. (1996). Effects of dietary **fumonisin B1**-containing culture material, **deoxynivalenol**-contaminated wheat or their combination on growing barrows. *American Journal of Veterinary Research*, **57**: 1790-1794
- Hawksworth, D.L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, **95**: 641-655
- Hetmanski, M.T., Scudamore, K.A. (1991). Detection of **zearalenone** in cereal extracts using high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *J Chromatogr. A*, Volume 588 (1-2): 47-52
- Hinojo, M.J., Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M. and Mateo, R. (2006). **Fumonisin** production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. *Food Microbiology*, **23**: 119-127
- Hopmans, E.C. (1997). **Patulin**: a Mycotoxin in Apples. *Perishables Handling Quarterly Issue*, n.º 91: 5-6
- Hsueh, C.-C., Liu, Y. and Freund, M.S. (1999). Indirect Electrochemical Detection of **Type-B Trichothecene Mycotoxins**. *Anal. Chem.*, **71**: 4075-4080
- Humpf, H.-U. and Voss, K.A. (2004). Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of **fumonisin mycotoxins**. *Mol. Nutr. Food Res.*, **48**: 255-269
- Hurburgh Jr., C.R. **Mycotoxins** in the Grain Market. *Iowa Grain Quality Initiative Publications - Testing & Storage*. in <http://www.extension.iastate.edu/grain/info/mycotoxinsinthegrainmarket.htm>
- Hurst W.J., Martin R.A. and Vestal C.H. (1991). The use of HPLC thermospray MS for the confirmation of **aflatoxins** in peanuts. *Journal Liq. Chromatogr.*, **14**: 2541-2550
- Hussein, H.S. and Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of **mycotoxins** on humans and animals. Review. *Toxicology*, **167**: 101-134
- Iha, M.H., Sabino, M. (2006). Determination of **patulin** in apple juice by liquid chromatography. *J AOAC Int* **89** (1):139-43
- Jacobsen, B.J., Bowen, K.L., Shelby, R.A., Diener, U.L., Kemppainen, B.W. and Floyd, J. (1993). **Mycotoxins** and Mycotoxicoses. in <http://www.aces.edu/dept/grain/ANR-767.php>
- Jestoi, M., Ritieni, A. and Rizzo, A. (2004). Analysis of the *Fusarium* Mycotoxins Fusaproliferin and **Trichothecenes** in Grains Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.*, **52**: 1464-1469
- Jodlbauer, J., Zöllner, P. and Lindner, W. (2000). Determination of zearanol, taleranol, **zearalenone**, α - and β -zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, Volume 51 (11-12): 681-687
- Jørgensen, K., Vahl, M. (1999). Analysis of **ochratoxin A** in pig kidney and rye flour using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *Food Addit. Contam.*, **16** (11): 451-456
- Josephs, R.D., Schuhmacher, R. and Krska, R. (2001). International interlaboratory study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins **zearalenone** and **deoxynivalenol** in agricultural commodities. *Food Addit. Contam.*, **18** (5): 417-430

- Kadalkal, Ç. and Nas, S. (2003)**. Effect of heat treatment and evaporation on **patulin** and some other properties of apple juice. *J Sci Food Agric.*, **83**: 987-990
- Kamkar, A. (2005)**. A study on the occurrence of **aflatoxin M1** in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control*, **16**: 593-599
- Kawashima, L.M., Valente Soares, L.M. (2006)**. Incidência de **fumonisina B1**, **aflatoxinas B1, B2, G1 e G2**, **ocratoxina A** e **zearalenona** em produtos de milho. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **26** (3): 516-521
- Kawashima, L.M., Valente Soares, L.M. and Massaguer, P.R. (2002)**. The development of an analytical method for two mycotoxins, **Patulin** and **Verruculogen**, and survey of their presence in commercial tomato pulp. *Brazilian Journal of Microbiology*, **33**: 269-273
- Kim, E. K., Shon, D. H., Ryu, D., Park, J. W., Hwang, H. J. and Kim, Y. B. (2000)**. Occurrence of **aflatoxin M1** in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Addit. Contam.*, **17** (1): 59-64
- Klötzel, M., Gutsche, B., Lauber, U. and Humpf, H.-U. (2005)**. Determination of 12 **Type A and B Trichothecenes** in Cereals by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.*, **53**: 8904-8910
- Kok Th., W. (1994)**. Derivatization reactions for the determination of **aflatoxins** by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr. B: Biomedical Applications*, Volume 659 (1-2): 127-137
- Kokkonen, M., Jestoi, M., Rizzo, A. (2005)**. Determination of selected **mycotoxins** in mould cheeses with liquid chromatography coupled tandem with mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, Volume 22 (5): 449-456
- Kos, G., Lohninger, H. and Krska, R. (2002)**. Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR) as a tool for the detection of **Fusarium** fungi on maize. *Vibrational Spectroscopy*, **29**: 115-119
- Kos, G., Lohninger, H. and Krska, R. (2003)**. Development of a method for the determination of **Fusarium** Fungi on corn using Mid-Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflection and Chemometrics. *Anal. Chem.*, **75**: 1211-1221
- Krska, R., Welzig, E., Berthiller, F., Molinelli, A., Mizaikoff, B. (2005)**. Advances in the analysis of **mycotoxins** and its quality assurance. *Food Addit. Contam.*, **22** (4): 345-353
- Krska, R., Josephs, R. (2001)**. The state-of-the-art in the analysis of **estrogenic mycotoxins** in cereals. *Fres. J Anal. Chem.*, **369**: 469-476
- Kryger, R.A. (2001)**. Volatility of **Patulin** in Apple Juice. *J Agric Food Chem.*, **49**: 4141-4143
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H. (1987)**. Risk assessment of the mycotoxin **zearalenone**. *Regul Toxicol Pharmacol.*, **7** (3):253-306
- Landi, L. (1997)**. The **Fumonisin**s, Environmental Distribution and their effects on Humans and Animals. in <http://www.cesil.com/0798/enland07.htm>
- Langseth, W. and Rundberget, T. (1998)**. Instrumental methods for determination of nonmacrocytic **trichothecenes** in cereals, foodstuffs and cultures. *J Chromatogr A*, **815**: 103-121
- Langseth, W. and Rundberget, T. (1999)**. The occurrence of HT-2 toxin and other **trichothecenes** in Norwegian cereals. *Mycopathologia*, **147**: 157-65
- Larson, E.** Minimizing **Aflatoxin** in Corn. Mississippi State University. in <http://msucares.com/pubs/infosheets/is1563.pdf>

- Larsson, K. and Möller, T. (1996). Liquid Chromatographic Determination of **Ochratoxin A** in Barley, Wheat Bran, and Rye by the AOAC/IUPAC/NMKL Method: NMKL Collaborative Study. *J AOAC Int.*, **79** (5): 1102-1105
- Lau, B.P.-Y., Scott, P.M., Lewis, D.A., Kanhere, S.R. (2000). Quantitative determination of **ochratoxin A** by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, Volume 35 (1): 23-32
- Lawlor, P.G. and Lynch, P.B. (2001). **Mycotoxins** in pig feeds: Source of toxins, prevention and management of mycotoxicosis. *Irish Veterinary Journal*, Vol. 54 (3): 117–120
- Lea, T., Steien, K. and Stormer, F.C. (1989). Mechanism of **ochratoxin A**-induced immunosuppression. *Mycopathologia*, **107**: 153-159
- Leblanc, J.-C., Tard, A., Volatier, J.-L., Verger, P. (2005). Estimated dietary exposure to principal food **mycotoxins** from The First French Total Diet Study. *Food Addit. Contam.*, **22** (7): 652-672
- Lee, P.K., Kee, S.Y.K., W. Ng and Gopalakrishnakone, P. (1999). Determination of **Trichothecene Toxin (T2 Mycotoxin)** in Aqueous Sample with Solid Phase Microextraction Technique Followed by Gas Chromatography with Flame Ionization Detection. Short Communications. *J High Resol Chromatogr.*, **22** (7): 424-426
- Leggott, N.L. and Shephard, G.S. (2001). **Patulin** in South African commercial apple products. *Food Control*, **12**: 73-76
- Leitner, A., Zollner, P., Paolillo, A., Stroka, J., Papadopoulou-Bouraoui, A., Jaborek, S., Anklam, E., Lindner, W. (2002). Comparison of methods for the determination of **ochratoxin A** in wine. *Anal. Chim. Acta*, **453**: 33-41.
- Leoni, L.A.B., Furlani, R.P.Z., Valente Soares, L.M. and Oliveira, P.L.C. (2001). **Ochratoxin A** in Brazilian Green Coffee. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **21** (1): 105-107
- Leszczunskz, J., Masłowska, J., Owczarek, A., Kucharska, U. (2000). Determination of **Aflatoxins** in Food Products by the ELISA Method. *Czech J. Food Sci.*, Vol. 19 (1): 8-12
- Li, F.-Q., Yoshizawa, T., Kawamura, O., Lou, X.-Y., Li, Y.-W. (2001). **Aflatoxins** and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *J Agric.Food Chem.*, Volume 49 (8): 4122-4126
- Li, F.-Q., Luo, X.-Y. and Yoshizawa, T. (1999). **Mycotoxins (Trichothecenes, Zearalenone and Fumonisins)** in Cereals Associated with Human Red-Mold Intoxications Stored Since 1989 and 1991 in China. *Natural Toxins*, **7**: 93-97
- Lin, L.-C., Chen, P.-C., Fu, Y.-M., Shih, D.Y.-C. (2005). **Ochratoxin A** contamination in coffees, cereals, red wines and beers in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, Volume 13 (1): 84-92
- Lin, L., Zhang, J., Wang, P., Wang, Y. and Chen, J. (1998). Thin-layer chromatography of **mycotoxins** and comparison with other chromatographic methods. Review. *J Chromatogr A*, **815**: 3-20
- Lindenmeier, M., Schieberle, P. and Rychlik, M. (2004). Quantification of **ochratoxin A** in foods by a stable isotope dilution assay using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1023**: 57-66
- Lino, C.M. Micotoxinas em alimentos e suas repercussões. in http://www.dq.fct.unl.pt/forum_da_quimica/2005/cv/CelesteLino.pdf
- Lino, C.M., Baeta, L., Pena, A.S. and Silveira, I.N. (2006a). Determination of **Ochratoxin A** in Coriander (*Coriandrum Sativum L.*) by PCL/Fluorescence Detection. *Química Nova*, Vol. 29, n.º 3: 436-439

- Lino, C.M., Silva, L.J.G. e Pena, A.S. (2006b).** Metodologias Analíticas para determinação das **Fumonisin** em milho e alimentos à base de milho. *Quim. Nova*, Vol. 29, n.º 2, 293-299
- Lino, C.M., Silva, L.J.G., Pena, A.L.S. (2004).** **Fumonisin**: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. *Rev. Port. Cienc. Vet.*, **99** (552): 181-192
- Lino, C.M., Silva, L.J.G., Pena, A.L.S. and Silveira, M.I. (2006c).** Determination of **fumonisin B1 and B2** in Portuguese maize and maize-based samples by HPLC with fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, **384** (5): 1214-1220
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J., Valle-Algarra, F.M. and Jiménez, M. (2004).** Influence of environmental factors on the biosynthesis of **type B trichothecenes** by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *International Journal of Food Microbiology*, **94**: 43-54
- Lo Curto, R., Pellicanò, T., Vilasi, F., Munafò, P. and Dugo, G. (2004).** **Ochratoxin A** occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. *Food Chemistry*, **84**: 71-75
- Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A. and Bottalico, A. (2002).** Toxigenic *Fusarium* species and **mycotoxins** associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 597-609
- Lombaert, G.A. (2002).** Methods for the determination of **deoxynivalenol** and other **trichothecenes** in foods. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **504**: 141-153
- MacDonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E., Shepherd, M.J. (1999).** **Ochratoxin A** in dried vine fruit: Method development and survey. *Food Addit. Contam.*, **16** (6): 253-260
- Machinski Jr., M., Soares, L.M., Sawazaki, E., Bolonhezi, D., Castro, J.L. and Bortolotto, N. (online: 2001).** **Aflatoxins, ochratoxin A** and **zearalenone** in Brazilian corn cultivars. *J Sci Food Agric.*, **81**: 1001-1007
- Magliulo, M., Mirasoli, M., Simoni, P., Lelli, R., Portanti, O. and Roda, A. (2005).** Development and Validation of an Ultrasensitive Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for **Aflatoxin M1** in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (9): 3300-3305
- Majumdar, S., Jayas, D.S., Hehn, J.L. and Bulley, N.R. (1996).** Classification of various grains using optical properties. *Canadian Agric. Eng.*, **38** (2): 139-144
- Mallmann, C.A., Santurio, J.M. and Dilkin, P. (1999).** Equine Leukoencephalomalacia Associated with Ingestion of Corn Contaminated with **Fumonisin B1**. *Revista de Microbiologia*, **30**: 249-252
- Malone, B.R., Humphrey, C.W., Romer, T.R. and Richard, J.L. (1998)** One-step solid phase extraction clean-up and fluorometric analysis of **deoxynivalenol** in grains. *J. AOAC Int.*, **81**: 448-452
- Maragos, C.M. (2004).** Emerging technologies for **mycotoxin** detection. *Journal of Toxicology - Toxin Reviews*. Volume 23 (2-3): 317-344
- Maragos, C.M., Jolley, M.E., Nasir, M.S. (2002).** Fluorescence polarization as a tool for the determination of **deoxynivalenol** in wheat. *Food Addit. Contam.*, **19** (4): 400-407
- Maragos, C.M., Thompson, V.S. (1999).** Fiber-optic Immunosensor for **mycotoxins**. *Natural Toxins*, **7**: 371-376

- Marasas, W.F.O. (2001).** Discovery and Occurrence of the **Fumonisin**s: A Historical Perspective. *Environmental Health Perspectives*, **109** (2): 239-243
- Martins, M.L., Gimeno, A., Martins, H.M., Bernardo, F. (2002).** Co-occurrence of **patulin** and **citrinin** in Portuguese apples with rotten spots. *Food Addit. Contam.*, **19** (6): 568-574
- Martins, M.L. and Martins, H.M. (2002).** Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of **deoxynivalenol** and **zearalenone** in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. *Food Chemistry*, **79**: 315-318
- Martins, M.L., Martins, H.M. and Bernardo, F. (2001).** **Aflatoxins** in spices marketed in Portugal. *Food Addit. Contam.*, **18** (4): 315-319
- Martins, M.L., Martins, H.M. and Bernardo, F. (2003).** Fungal flora and **mycotoxins** detection in commercial pet food. *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, **98** (548): 179-183
- Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M. (2005).** Study of Spanish grape mycobiota and **ochratoxin A** production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 71 (8): 4696-4702
- Meister, U. (2001).** Investigations on the change of **fumonisin** content of maize during hydrothermal treatment of maize. Analysis by means of HPLC methods and ELISA. *Eur Food Res Technol.*, **213**: 187-193
- Méllote, L. (2004).** Survey on the analysis of **mycotoxins**. *Journal of the Institute of Brewing*, **110**, n.º 3: 235-239
- Méndez-Albores, A., Arámbula-Villa, G., Loarca-Piña, M.G.F., Castaño-Tostado, E. and Moreno-Martínez, E. (2005).** Safety and efficacy evaluation of aqueous citric acid to degrade **B-aflatoxins** in maize. *Food and Chemical Toxicology*, **43**: 233-238
- Menniti, A.M., Pancaldi, D., Maccaferri, M. and Casalini, L. (2003).** Effect of fungicides on *Fusarium* head blight and **deoxinivalenol** content in durum wheat grain. *European Journal of Plant Pathology*, **109**: 109-115
- Milanez, T.V., Valente-Soares, L.M. and Baptista, G.G. (2006).** Occurrence of **trichothecene** mycotoxins in Brazilian corn-based food products. *Food Control*, **17**: 293-298
- Moake, M.M., Padilla-Zakour, O.I. and Worobo, R.W. (2005).** Comprehensive Review of **Patulin** Control Methods in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 1: 8-21
- Molina, M. and Giannuzzi, L. (2002).** Modelling of **aflatoxin** production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Research International*, **35**: 585-594
- Mortensen, G.K., Strobel, B.W. and Hansen, H.C.B. (2005).** Degradation of **zearalenone** and **ochratoxin A** in three Danish agricultural soils. *Chemosphere*, **62**: 1673-1680
- Mortimer, D.N., Gilbert, J. and Shepherd, M.J. (1987).** Rapid and sensitive analysis of **aflatoxin M1** in liquid and powdered milks using an affinity column clean-up. *J Chromatogr A*, **407**: 393-398
- Mullett, W., Lai, E.P., Yeung, J.M. (1998).** Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor. *Anal Biochem.* **258** (2): 161-167
- Munkvold, G., Hurburgh, C., Meyer, J., Loy, D. and Robertson, A. (2005).** **Aflatoxins** in Corn. Iowa State University. in <http://www.extension.iastate.edu/Publications/PM1800.pdf>
- Munkvold, G.P. and Desjardins, A.E. (1997).** **Fumonisin**s in Maize. Can We Reduce Their Occurrence? *Plant Disease*, **81**, n.º 6: 556-564

- Muro-Cacho, C.A., Stedeford, T., Banasik, M., Suchecki, T.T. and Persad, A.S. (2004). **Mycotoxins**: mechanisms of toxicity and methods of detection for identifying exposed individuals. *Journal of land use*, Vol. 19 (2): 537-545
- Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D., Desjardins, A.E. (1992). **Fumonisin B1** production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 58 (3): 984-989
- Nesheim, S. and Brumley, W.C. (1981). Confirmation of identity of **aflatoxins**. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Volume 58 (12): A945-A949
- Ngundi, M.M., Shriver-Lake, L.C., Moore, M.H., Lassman, M.E., Ligler, F.S. and Taitt, C. R. (2005). Array Biosensor for Detection of **Ochratoxin A** in Cereals and Beverages. *Anal. Chem.*, 77: 148-154
- Nielsen, K.F. and Smedsgaard, J. (2003). Fungal metabolite screening: database of 474 **mycotoxins** and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. *J Chromatogr A*, 1002: 111-136
- Njapau, H., Muzungaile, E.M. and Changa, R.C. (1998). The Effect of Village Processing Techniques on the Content of **Aflatoxins** in Corn and Peanuts in Zambia. *J Sci Food Agric.*, 76: 450-456
- Oliveira, A.Q. e Valente Soares, L.M. (2001). Avaliação de métodos para determinação de **tricotecenos** em milho por cromatografia gasosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 60 (2): 129-134
- Oliveira, M.S., Prado, G., Abrantes, F.M., Santos, L.G. e Veloso, T. (2002). Incidência de **Aflatoxinas**, **Desoxinivalenol** e **Zearalenona** em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998-2000. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 61 (1): 1-6
- Olsson, J., Börjesson, T., Lundstedt, T., Schnürer, J. (2002). Detection and quantification of **ochratoxin A** and deoxinivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *International Journal of Food Microbiology*, 72: 203-214
- Paepens, C., De Saeger, S., Van Poucke, C., Dumoulin, F., Van Calenbergh, S., Van Peteghem, C. (2005). Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantification of fumonisin B1, B2 and B3 in cornflakes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 19 (14): 2021-2029
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, A.J. and Sanchis, V. (2004). Occurrence of Ochratoxigenic Fungi and **Ochratoxin A** in Green Coffee from Different Origins. *Food Sci Tech Int*, 10 (1): 45-49
- Pascale, M. and Visconti, A. (2000). Rapid method for the determination of **ochratoxin A** in urine by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Mycopathologia*, 152: 91-95
- Patiño, B., Mirete, Salvador, Vázquez, C., Jiménez, M., Rodríguez, M. T. and González-Jaén, M. T. (2006). Characterization of *Fusarium verticillioides* strains by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *J Sci Food Agric.*, 86: 429-435
- Pazzi, M., Medana, C., Brussino, M. and Baiocchi, C. (2005). Determination of **Aflatoxins** in Peanuts, Maize Feed and whole Milk by HPLC-MS and MS Tandem Mass Spectrometry. *Annali di Chimica*, 95: 803-811
- Peraica, M., Radic B., Lucic, A. and Pavlovic (1999). Toxic effects of **mycotoxins** in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (9): 754-766

- Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N. and Castegnaro, M. (1988). **Ochratoxin A** in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Addit. Contam.*, **5** (3): 299-301
- Pettersson, H., Aberg, L. (2003). Near infrared spectroscopy for determination of **mycotoxins** in cereals. *Food Control*, **14**: 229-232
- Pfohl-Leskowicz, A., Bartsch, H., Azémar, B., Mohr, U., Estève, J. and Castegnaro, M. (2002). Mesna Protects Rats against Nephrotoxicity but not Carcinogenicity Induced by **Ochratoxin A**, Implicating Two Separate Pathways. *Facta Universitatis. Series: Medicine and Biology*, **9**, n.º 1: 37-43
- Picco, M., Nesci, A., Barros, G., Cavaglieri, L. and Etcheverry, M. (1999). **Aflatoxin B1** and **Fumonisin B1** in Mixed Cultures of *Aspergillus flavus* and *Fusarium proliferatum* on Maize. *Natural Toxins*, **7**: 331-336
- Piemontese, L., Solfrizzo, M., and Visconti, A. (2005). Occurrence of **patulin** in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. *Food Addit. Contam.*, **22** (5): 437-442
- Pittet, A. (1998). Natural occurrence of **mycotoxins** in foods and feeds - An updated review. *Revue de Medecine Veterinaire*, Volume 149 (6): 479-492
- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F. and Macdonald, A.M.C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with **Fusarium** mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, **78**: 21-37
- Plattner, R.D. (1999). HPLC/MS Analysis of **Fusarium** Mycotoxins, **Fumonisins** and **Deoxynivalenol**. Research Article. *Natural Toxins*, **7**: 365-370
- Pohiand, A.E., Thorpe, C.W. and Nesheim, S. (1979). Newer developments in mycotoxin methodology. *Pure and Appl. Chem.*, Vol. 52, pp. 213-223
- Pozzi, C.R., Arcaro, J.R.P., Júnior, I.A., Fagundes, H. e Corrêa, B. (2002). Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de **Fumonisin**s. *Ciência Rural*, Santa Maria, vol. 32, n.º 5, p. 901-907
- Quillien, J.F. (2002). **Mycotoxins**. INRA. SME, n.º 3. Project n.º QLK1-CT - 2000 – 00040. in <http://www.nutrition.org.uk/upload/FF4%20mycotoxins.pdf>
- Radová, Z., Holadová, K., Hajslová, J. (1998). Comparison of two clean-up principles for determination of **trichothecenes** in grain extract. *J Chromatog. A*, Volume 829 (1-2): 259-267
- Ramirez, M.L., Chulze, S. and Magan, N. (2004). Impact of environmental factors and fungicides on growth and **deoxynivalenol** production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, **23**: 117-125
- Ramirez, M.L., Chulze, S. and Magan, N. (2006). Temperature and water activity effects on growth and temporal **deoxynivalenol** production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, **106**: 291-296
- Ratola, N., Barros, P., Simões, T., Cerdeira, A., Venâncio, A. and Alves, A. (2006). Worldwide interlaboratory study on the determination of **ochratoxin A** in different wine type samples. *Talanta*, Volume 70 (4): 720-731
- Ratola, N., Martins, L. and Alves, A. (2004). **Ochratoxin A** in wines: Assessing global uncertainty associated with the results. *Analytica Chimica Acta*, **513**: 319-324
- Reinhard, H., Zimmerli, B. (1999). Reversed-phase Liquid Chromatographic Behaviour of the mycotoxins Citrinin and **Ochratoxin A**. *J Chromatogr A*, **862**: 147-159

- Richard, J.L., Plattner, R.D., May, J. and Liska, S.L. (1999). The occurrence of **ochratoxin A** in dust collected from a problem household. *Mycopathologia*, **146**: 99-103
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y.-J. and Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of **ochratoxin A**, an update. Mini review. *Chemico-Biological Interactions*, **159**: 18-46
- Ritieni, A., Moretti, A., Logrieco, A., Bottalico, A., Randazzo, G., Monti, S.M., Ferracane, R. and Fogliano, V. (1997). Occurrence of fusaproliferin, **fumonisin B1** and beauverecin in maize from Italy. *Journal of Agriculture Food Chemical*, **45**: 4011-4016
- Roach J.A.G., White K.D., Trucksess M.W., Thomas F.S. (2000). Capillary gas chromatography/mass spectrometry with chemical ionization and negative ion detection for confirmation of identity of **patulin** in apple juice. *J AOAC Int* **83** (1):104-112
- Romer, T.R. (1986). Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of **trichothecene** mycotoxins in foods and feeds. *J AOAC Int.*, **69** (4): 699-703
- Ross, G.U., Taniwaki, M.H., Sabino, M., Vizoni, T. and Hirooka, E.Y. (1998). Produção de **patulina** em maçã (*Malus domestica* Borkhausen), cultivares Gala e Fuji inoculadas com *Penicillium* spp. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, vol. 18, n.º 1: 63-67
- Roybal, J.E., Munns, R.K., Morris, W.J., Hurlbut, J.A., Shimoda, W. (1988). Determination of zearanol/zearalenone and their metabolites in edible animal tissue by liquid chromatography with electrochemical detection and confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int.*, **71** (2): 263-271
- Rumora, L., Kovacic, S., Rozgaj, R., Cepelak, I., Pepeljnjak, S., Grubisic, T.Z. (2002). Cytotoxic and genotoxic effects of **fumonisin B1** on rabbit kidney RK13 cell line. *Arch. Toxicol.*, **76**: 55-61
- Rundberget, T., Wilkins. A.L. (2002). Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **964**: 189-197
- Ryu, J.-C., Yang, J.-S., Song, Y.-S., Kwon, O.-S., Park, J., Chang, I.-M. (1996). Survey of natural occurrence of **trichothecene** mycotoxins and **zearalenone** in Korean cereals harvested in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, Volume 13 (3): 333-341
- Saad, N. (last update 2004). **Aflatoxins**: Occurrence and Health Risks. in <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html>
- Sáez, J.M., Medina, Á., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo, R. and Jiménez, M. (2004). Comparison of different sample treatments for the analysis of **ochratoxin A** in must, wine and beer by liquid chromatography. *J Chromatogr A*, **1029**: 125-133
- Salas, M.V.R.G. (2001). Desafíos en la lucha contra las **Micotoxinas**. in <http://www.monografias.com/trabajos14/micotoxinas/micotoxinas.shtml>
- Sales, A.C., Yoshizawa, T. (2005). Mold counts and *Aspergillus* section *Flavi* populations in rice and its by-products from the Philippines. *Journal of Food Protection*, Volume 68 (1): 120-125
- Samar, M.M., Resnik, S.L. (2002). Analytical methods for **trichothecenes** surveillance - An overview over the period 1990-2000. *Food Science and Technology International*, Volume 8 (5): 257-268
- Sanchis, V., Marín, S. y Ramos, A.J. (2000). Control de **micotoxinas** emergentes. Situación legislativa actual. *Rev. Iberoam. Micol.*, **17**: S69-S75

- Sano, A., Matsutani, S., Suzuki, M. and Takitani, S. (1987). High-performance liquid chromatographic method for determining [trichothecene](#) mycotoxins by post-column fluorescence derivatization. *J Chromatogr A*, **410**: 427-436
- Santos, E.A. and Vargas, E.A. (2002). Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of [ochratoxin A](#) in green coffee. *Food Addit. Contam.*, **19** (5): 447-458
- Sapsford, K.E., Ngundi, M.M., Moore, M.H., Lassman, M.E., Shriver-Lake, L.C., Taitt, C.R. and Ligler, F.S. (2006). Rapid detection of foodborne contaminants using an Array Biosensor. *Sensors and Actuators B*, **113**: 599-607
- Sasaki, T.A. and Wilkins, C.L. (1999). Gas chromatography with Fourier transform infrared and mass spectral detection. Review. *J Chromatogr A*, **842**: 341-349
- Schaafsma, A.W., Nicol, R.W., Savard, M.E., Sinha, R.C., Reid, L.M. and Rottinghaus, G. (1998). Analysis of *Fusarium* toxins in maize and wheat using thin layer chromatography. *Mycopathologia*, **142**: 107-113
- Schothorst, R.C., Jekel, A.A., Van Egmond, H.P., Mul, A., Boon, P.E. and Van Klaveren, J.D. (2005). Determination of [trichothecenes](#) in duplicate diets of young children by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *Food Addit. Contam.*, **22** (1): 48-55
- Schwadorf, K. and Müller, H.-M. (1992). Determination of α - and β -zearalenol and [zearalenone](#) in cereals by gas chromatography with ion-trap detection. *J Chromatogr.*, **595**: 259-267
- Schwarzer, K. (2002). Reducing zearalenone impact on semen quality. *Pig Progress*, **18** (5): 33-35
- Scott, P.M., Trucksess, M.W. (1997). Application of Immunoaffinity Columns to [Mycotoxin](#) Analysis. *JAOAC Int.*, **80** (5): 941-949
- Scott, P.M. (1974). Collaborative Study of a chromatographic method for determination of Patulin in Apple Juice. *JAOAC Int.*, **57** (3): 621-625
- Scott, P.M. (2002). Methods of analysis for [ochratoxin A](#). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **504**: 117-134
- Šegvić, M., Pepeljnjak, S. (2001). [Fumonisin](#) and their effects on animal health. *Vet. Arhiv.*, **71**: 299-323
- Sekiyama, B.L., Ribeiro, A.B., Machinski, P.A., Machinski Jr., M. (2005). [Aflatoxins](#), [ochratoxin A](#) and [zearalenone](#) in maize-based food products. *Brazilian Journal of Microbiology*, **36**: 289-294
- Serra, R., Mendonça, C., Abrunhosa, L., Pietri, A. and Venâncio, A. (2004). Determination of [ochratoxin A](#) in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. *Analytica Chimica Acta*, **513**: 41-47
- Sewram, V., Nair, J.J., Nieuwoudt, T.W., Leggott, N.L. and Shephard, G.S. (2000). Determination of [patulin](#) in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **897**: 365-374
- Sforza, S., Dall'Asta, C., and Marchelli, R. (2006). Recent advances in [mycotoxin](#) determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **25**: 54-76
- Shephard, G.S. and Leggott, N.L. (2000). Chromatographic determination of the mycotoxin [patulin](#) in fruit and fruit juices. Review. *J Chromatogr A*, **882**: 17-22

- Shephard, G.S., Fabiani, A., Stockenström, S., Mshicileli, N. and Sewram, V. (2003). Quantitation of [Ochratoxin A](#) in South African Wines. *J Agric Food Chem.*, **51**: 1102-1106
- Sheu, F. and Shyu, Y.T. (1999). Analysis of [Patulin](#) in Apple Juice by Diphasic Dialysis Extraction with in Situ Acylation and Mass Spectrometric Determination. *J Agric Food Chem.*, **47**: 2711 -2714
- Siantar, D.P., Halverson, C.A., Kirmiz, C., Peterson, G.F., Hill, N.R. and Dugar, S.M. (2003). [Ochratoxin A](#) in Wine: Survey by Antibody- and Polymeric-based SPE Columns Using HPLC/Fluorescence Detection. *Am. J. Enol. Vitic.*, **54** (3):170-177
- Sibanda, L., De Saeger, S., Bauters, T.G.M., Nelis, H.J., Van Peteghem, C. (2001). Development of a flow-through enzyme immunoassay and application in screening green coffee samples for [ochratoxin A](#) with confirmation by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Protection*, Volume 64 (10): 1597-1602
- Sibanda, L., De Saeger, S. and Van Peteghem, C. (1999). Development of a portable field immunoassay for the detection of [aflatoxin M1](#) in milk. *International Journal of Food Microbiology*, **48**: 203-209
- Skaug, M.A., Eduard, W. and Størmer, F.C. (2000). [Ochratoxin A](#) in airborne dust and fungal conidia. *Mycopathologia*, **151**: 93-98
- Skovgaard, N. (2003). Evaluations of certain [mycotoxins](#) in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **85**: 203-207
- Soares, L.M., Rodriguez-Amaya, D.B. (1989). Survey of [aflatoxins](#), [ochratoxin A](#), [zearalenone](#), and [sterigmatocystin](#) in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *JAOAC Int.*, **72** (1): 22-26
- Sokolovic, M. and Simpraga, B. (2005). Survey of [trichothecene mycotoxins](#) in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. *Food Control*, **17**: 733-740
- Soleas, G.J., Yan, J., Goldberg, D.M. (2001). Assay of [ochratoxin A](#) in wine and beer by high pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *J Agric Food Chem.*, **49**: 2733-2740
- Soriano, J.M., Dragacci, S. (2004). Intake, decontamination and legislation of [fumonisins](#) in foods. *Food Research International*, Volume 37 (4): 367-374
- Soufleros, E.H., Tricard, C. and Bouloumpasi, E. C. (online: 2003). Occurrence of [ochratoxin A](#) in Greek wines. *J Sci Food Agric.*, **83**: 173-179
- Stinsonm, E.E., Osman, S.F., Huhtanen, C.N. and Bills, D.D. (1978). Disappearance of [Patulin](#) during Alcoholic Fermentation of Apple Juice. *Applied and Environmental Microbiology*, **36**, n.º 4, pp. 620-622
- Stoev, S.D., Vitanov, S., Anguelov, G., Petkova-Bocharova, T. and Creppy, E.E. (2001). Experimental Mycotoxic Nephropathy in Pigs Provoked by a Diet Containing [Ochratoxin A](#) and Penicillic Acid. *Veterinary Research Communications*, **25**: 205-223
- Stroka, J. and Anklam, E. (2002). New strategies for the screening and determination of [aflatoxins](#) and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. *trends in analytical chemistry*, vol. 21, n.º 2, pp. 90-95
- Stroka, J., Spanjer, M., Buechler, S., Barel, S., Kos, G. and Anklam, E. (2004). Novel sampling methods for the analysis of [mycotoxins](#) and the combination with spectroscopic methods for the rapid evaluation of [deoxynivalenol](#) contamination. *Toxicology Letters*, **153**: 99-107

- Sudakin, D.L. (2003). *Trichothecenes* in the environment: relevance to human health. Minireview. *Toxicology Letters*, **143**: 97-107
- Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 *mycotoxins* in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**: 2649-2659
- Swamy, H.V.L.N., Smith, T.K., MacDonald, E.J., Boermans, H.J., Squires, E.J. (2002). Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *Journal of Animal Science*, Volume 80 (12): 3257-3267
- Takino, M., Daishima, S. and Nakahara, T. (2003). Liquid chromatography/mass spectrometric determination of *patulin* in apple juice using atmospheric pressure photoionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17**: 1965-1972
- Tanaka, T., Hasegawa, A., Matsuki, Y., Lee, U.S., Ueno, Y. (1985). Rapid and sensitive determination of *zearalenone* in cereals by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr. A*, Volume 328: 271-278
- Tarter, E.J., Scott, P.M. (1991). Determination of *patulin* by capillary gas chromatography of the heptafluorobutyrate derivative. *J Chromatogr.*, Volume 538 (2): 441-446
- Téren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E. and Kevei, F. (1996). Immunochemical detection of *ochratoxin A* in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, **134**: 171-176
- Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. and Gelderblom, W. C.A. (1992). The implications of naturally occurring levels of *fumonisin* in corn for human and animal health. *Mycopathologia*, **117**: 3-9
- Trenholm, H.L., Warner, R.M. and Prelusky, D.B. (1985). Assessment of extraction procedures in the analysis of naturally contaminated grain products deoxynivalenol (vomitoxin). *J AOAC Int.*, **68** (4): 645-649
- Trigo-Stockli, D.M., Deyoe, C.W., Satumbaga, R.F. and Pedersen, J.R. (1996). Distribution of *Deoxynivalenol* and *Zearalenone* in Milled Fractions of Wheat. *Cereal Chem.*, **73** (3): 388-391
- Trucksess, M.W., Weaver, C., Oles, C., D'Ovidio, K., Rader, J.I. (2006). Determination of *mycotoxins* in botanical roots. *Acta Horticulturae*, Volume 720: 103-112
- Trucksess, M.W., Brumley, W.C. and Nesheim, S. (1984). Rapid Quantitation and Confirmation of *Aflatoxins* in Corn and Peanut Butter, using a Disposable Silica Gel Column, Thin Layer Chromatography and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J AOAC Int.*, **67** (5): 973-975
- Tsao, R., Zhou, T. (2000). Micellar electrokinetic capillary electrophoresis for rapid analysis of *patulin* in apple cider. *J Agric Food Chem.*, Volume 48 (11): 5231-5235
- Tseng, T-C and Liu, C-Y (1997). Occurrence of *fumonisin B1 and B2* in corn-based foodstuffs in Taiwan Market. *Mycopathologia*, **137**: 57-61
- Urraca, J.L., Benito-Peña, E., Pérez-Conde, C., Moreno-Bondi, M.C. and Pestka, J.J. (2005). Analysis of *Zearalenone* in Cereal and Swine Feed Samples Using an Automated Flow-Through Immunosensor. *J Agric Food Chem.*, **53**: 3338-3344

- Vaamonde, G., Patriarca, A., Pinto, V.F., Comerio, R. and Degrossi, C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, **88**: 79-84
- Vahl, M. and Jorgensen, K. (1998). Determination of aflatoxins in food using LC/MS/MS. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung A. Food Research and Technology*, **206**: 243-245
- Valenta, H., Dänicke, S., Flachowsky, G., and Böhme, T. (2002). Comparative study on concentrations of deoxynivalenol and zearalenone in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic maize hybrids. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.*, **10**: 182
- van der Gaag, B., Spath, S., Dietrich, H., Stigter, E., Boonzaaijer, G., van Osenbruggen, T. and Koopal, K., (2003). Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control*, **14**: 251-254
- van Egmond, H.P. (1989). Current situation on regulations for mycotoxin. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food Addit. Contam.*, **6** (2): 139-188
- van Egmond, H.P. and Paulsch, W.E. (1986). Determination of micotoxins. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 58 (2): 315-326
- Varga, J. and Kozakiewicz, Z. (2006). Ochratoxin A in grapes and grape derived products. *Trends in Food Science & Technology*, **17**: 72-81
- Varga, J., Péterfia, Z., Táboria, K., Térenb, J. and Vágvölgyi, C. (2005). Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, **99**: 321-328
- Vargas, E.A., Preis, R.A., Castro, L., Silva, C.M.G. (2001). Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 e G2, zearalenone and fumonisin in Brazilian corn. *Food Addit. Contam.*, **18**: 981-986
- Vega, V.A. (2005). Rapid extraction of aflatoxin from creamy and crunchy peanut butter. *J AOAC Int.*, **88** (5): 1383-1386
- Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, R., Ramos, A.J. and Sanchis, V. (online: 2000). Fumonisin B1, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* in mixed cultures on irradiated maize kernels. *J Sci Food Agric.*, **81**: 88-94
- Ventura, M., Guillén, D., Anaya, I., Broto-Puig, F., Lliberia, J.L., Agut, M., Comellas, L. (2006). Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A in beer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 20 (21): 3199-3204
- Ventura, M., Vallejos, C., Anaya, I.A., Broto-Puig, F., Agut, M., Comellas, L. (2003). Analysis of Ochratoxin A in Coffee by Solid-Phase Cleanup and Narrow-Bore Liquid Chromatography-Fluorescence Detector-Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.*, Volume 51 (26): 7564-7567
- Visconti, A., Boenke, A., Solfrizzo, M., Pascale M. and Doko, M.B. (1996). European intercomparison study for the determination of the fumonisins content in two maize materials. *Food Addit. Contam.*, **13** (8): 909-27
- Visconti, A., Pascale, M. (1998). Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A*, **815** (1): 133-140

- Visconti, A., Pascale, M. and Centonze, G. (1999). Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, **864**: 89-101
- Visconti, A., Pascale, M. and Centonze, G. (2000). Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *J Chromatogr A*, **888**: 321-326
- Visconti, A., Pascale, M. and Centonze, G. (2001). Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column clean-up and HPLC analysis with fluorometric detection: Collaborative study. *JAOAC Int.*, **84** (6): 1818-27
- Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Rosso, F., Nikolov, I., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M. and Dragacci, S. (2004). Analysis of Ochratoxin A in Foods Consumed by Inhabitants from an Area with Balkan Endemic Nephropathy: A 1 Month Follow-up Study. *J Agric Food Chem.*, **52**: 2404-2410
- Waalwijk, C., Kastelein, P., de Vries, I., Kerényi, Z., van der Lee, T., Hesselink, T., Köhl, J. and Kema, G. (2003). Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, **109**: 743-754
- Weidenbörner, M. (2001). Foods and fumonisins. *Eur Food Res Technol.*, **212**: 262-273
- Weingaertner, J., Krska, R., Praznik, W., Grasserbauer, M. and Lew, H. (1997). Use of Mycosep multifunctional clean-up columns for the determination of trichothecenes in wheat by electroncapture gas chromatography. *Fresenius' J Anal Chem.*, **357**: 1206-1210
- Whitlow, L.W. and Hagler Jr., W.M. (1999). Mycotoxin Characterization, Occurrence and Detection. in <http://www.txanc.org/proceedings/1999/mycodetection.pdf>
- Whitlow, L.W. and Hagler, Jr., W.M. (2005). Mycotoxins in Dairy Cattle: Occurrence, Toxicity, Prevention and Treatment. *Proc. Southwest Nutr. Conf.*: 124-138
- Widestrand, J., Lundh, T., Pettersson, H. and Lindberg, J.E. (2003). A rapid and sensitive cytotoxicity screening assay for trichothecenes in cereal samples. *Food and Chemical Toxicology*, **41**: 1307-1313
- Wilson, D. M. (1991). Aflatoxin analytical methods for groundnuts. in <http://www.fao.org/docrep/X5036E/x5036E0m.htm>
- Wiśniewska-Dmytrow, H., Kozak, A. and Śmudzki, J. (2004). Occurrence Of *Fusarium* Mycotoxins In Feedstuffs From Farms With Husbandry Problems. *Bull Vet Inst Pulawy*, **48**: 117-122
- Wittrup, C. (2000). Comparison of chemometric methods for classification of fungal extracts based on rapid fluorescence spectroscopy. *J Chemometrics*, **14**: 765-776
- Wogan, G.N., (1999). Aflatoxin as a Human Carcinogen. *Hepatology*, **30** (2): 573-575
- Xiulan, S., Xiaolian, Z., Jian, T., Xiaohong, G., Jun, Z. and Chu, F.S. (2006). Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B1 in foods. *Food Control*, **17**: 256-262
- Yiannikouris, A. and Jouany, J.-P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim. Res.*, **51**: 81-99
- Yong, R.K. and Cousin, M.A. (2001). Detection of moulds producing aflatoxins in maize and peanuts by an immunoassay. *International Journal of Food Microbiology*, **65**: 27-38
- Young, J.C., Zhu, H. and Zhou, T. (2006). Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. *Food and Chemical Toxicology*, **44**: 417-424
- Yu, J.-H. and Keller, N. (2005). Regulation of Secondary metabolism in Filamentous Fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **43**: 437-58

- Zheng, Z., Hanneken, J., Houchins, D., King, R.S., Lee, P. and Richard, J.L. (2005).** Validation of an ELISA test kit for the detection of **ochratoxin A** in several food commodities by comparison with HPLC. *Mycopathologia*, **159**: 265-272
- Zheng, M.Z., Richard, J.L. and Binder, J. (2006).** A review of rapid methods for the analysis of **mycotoxins**. *Mycopathologia*, **161**: 261-73
- Zöllner, P., Leitner, A., Lubda, D., Cabrera, K., Lindner, W. (2000).** Application of a Chromolith SpeedROD RP-18e HPLC column: Determination of **ochratoxin A** in different wines by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, **52**: 818-820

5.2 RELATÓRIOS E OUTROS DOCUMENTOS

1. **AFLATOXINS** Fact sheet. <http://www.micotoxinas.com.br/aflafacts.pdf>
2. Boletim Técnico n.º 37. **Patulin** in Apple Juice, Apple Juice Concentrates and Apple Juice Products.
3. Boletim Técnico n.º 36. Background Paper in Support of **Fumonisin** Levels in Corn and Corn Products Intended for Human Consumption. Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds. U. S. FDA (2001)
4. Documento de orientação destinado às autoridades competentes para o controlo do cumprimento da legislação da UE relativa às aflatoxinas (documento não tem qualquer valor jurídico formal). http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/aflatoxin_guidance_pt.pdf
5. European Mycotoxin Awareness Network. Mycotoxin Fact Sheets. <http://www.mycotoxins.com>
6. FAO, 1993. Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn. *FAO Food and Nutrition Paper 55*. Rome, Italy
7. FAO, 1997. Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995. A compendium. *FAO Food and Nutrition Paper 64*. Rome, Italy
8. FAO, 1997. Validation of Analytical Methods for Food Control – A Report of a Joint FAO/IAEA Expert Consultation. 2-4 December 1997. Vienna, Austria. *FAO Food and Nutrition Paper 68*. Rome, Italy
9. FAO, 2001 Manual on the application of the HACCP system in Mycotoxin Prevention and Control. FAO/IAEA Training and Reference Centre for Food and Pesticide Control. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAO Food and Nutrition Paper 73*. Rome, Italy
10. FAO, 2001. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *FAO Food and Nutrition Paper 74*. Rome, Italy
11. FAO, 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. *FAO Food and Nutrition Paper 81*. Rome, Italy
12. Final report of a mission carried out in the France from 21 to 30 October 2002
13. Final report of a mission carried out in the Netherlands from 11 to 13 February 2002
14. **Fumonisin** Page. <http://www.ansci.cornell.edu/courses/as625/1997term/Park>
15. IARC (1976). Some Naturally Occurring Substances. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 10. Lyon, France
16. IARC (1983). Some Food Additives, Feed Additives and Naturally Occuring Substances. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 31. Lyon, France

17. IARC (1986). Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 40. Lyon, France
18. IARC (1987). Overall Evaluations of Carcinogenicity. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 7. Lyon, France
19. IARC (1993). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines, and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 56. Lyon, France
20. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. <http://www.iarc.fr/>
21. International Agency for Research on Cancer (IARC) - Summaries & Evaluations (1997). AFLATOXINS. Naturally Occurring Aflatoxins
22. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2001: Geneva, Switzerland). Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO technical report series; 906*
23. Livro Branco sobre segurança dos alimentos, apresentado pela Comissão Europeia. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/com/1999/com1999_0719pt01.pdf
24. Mycotoxin Fact Sheets. European Mycotoxin Awareness Network (EMAN)
25. Mycotoxins in Grain, GASGA - Group for Assistance on Systems Relating to Grain after Harvest, CTA - Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation ACP-EU, *Technical Leaflet* n.º 3, Published by: CTA, Postbus 380, 6700 AJ Wageningen, The Netherlands, June 1997
26. Norma CEN (European Committee for Standardization) (1994) – Foodstuffs quantitative determination of **Ochratoxin A**. Part 1 – HPLC method for wheat flour; Part 2 - HPLC method for barley, maize and wheat bran.
27. Safety Data Sheet. **Aflatoxins** B1, B2, G1, G2, M1, M2 and P1. Division of Safety National Institutes of Health. <http://www.niehs.nih.gov/odhsb/datasheets/pdf/1162-65-8.pdf>
28. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series, No. 47. 2001. *FAO Food and Nutrition Paper 74*
29. SCF 1994. Scientific Committee for Food. European Commission DG XXIV Unit B3. Thirty-fifth Report. Opinion on **aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1** and **patulin**. Expressed on 23 September 1994
30. SCF 1998. Scientific Committee for Food. European Commission DG XXIV Unit B3. Opinion on **ochratoxin A**. September 1998
31. SCF 1999. Opinion of Scientific Committee on Food on **Fusarium** Toxins - Part 1: Deoxynivalenol (DON) December 1999. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf
32. SCF 2000a. Opinion of the Scientific Committee on Food on **Fusarium** Toxins Part 2: **Zearalenone** (ZEA) June 2000. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf
33. SCF 2000b. Opinion of the Scientific Committee on Food on **Fusarium** Toxins Part 3: **Fumonisin B1** (FB1) October 2000. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out73_en.pdf
34. SCF 2000c. Opinion of the Scientific Committee on Food on **Fusarium** Toxins Part 4: **Nivalenol** October 2000. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out74_en.pdf
35. SCF 2000d. Scientific Committee for Food. Opinion of the scientific committee on food on **fusarium** toxins, Part 2: Evaluation of **zearalenona**. Expressed on 22 June 2000
36. SCF 2000e. Scientific Committee for Food. Opinion of the scientific committee on food on fusarium toxins, Part 3: Evaluation of **Fumonisins**. Adopted on 17 October 2000
37. SCF 2001. Opinion of Scientific Committee on Food on **Fusarium** toxins Part 5: T-2 toxin and HT-2 toxin May 2001. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out88_en.pdf

38. SCF 2002. Scientific Committee for Food. Expressed on 27 February 2002. European Commission DG XXIV Unit B3. Opinion on *fusarium* toxins, Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf
39. SCF 2004a. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone (ZEA) as undesirable substance in animal feed. Adopted on July 2004
40. SCF 2004b. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. September 2004
41. SCOOP 1999. Reports on tasks for scientific cooperation - Report of experts participating in Task 3.2.7 (January 2002) Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States
42. SCOOP 2002. Directorate General Health and Consumer Protection. Reports on tasks for scientific cooperation - Report of experts participating in Task 3.2.8 (March 2002) Assessment of dietary intake of Patulin by the population of EU Member States
43. SCOOP 2003. Reports on tasks for scientific cooperation - Report of experts participating in Task 3.2.10 (April 2003) Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States
44. Standing Committee on the Food Chain and Animal Health. Section on Toxicological Safety of the Food Chain. Summary record of 3rd meeting – October 3rd, 2002
45. Summary record of the 1st meeting of the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health. *Sections*: General Food Law and Toxicological Security of the Food Chain held in Brussels on 21-22 February 2002
46. Summary record of the 79th meeting of the Standing Committee on Foodstuffs held in Brussels on the 14th and 15th of December 2000
47. Summary record of the 84th meeting of the Standing Committee on Foodstuffs held in Brussels on the 19th of September 2001
48. The Aflatoxin group. http://www.safefoodonline.com/Uploads/Aflatoxin_Group.pdf
49. The Fumonisin group. http://www.safefoodonline.com/uploads/fumonisin_group.pdf
50. The Ochratoxin group: http://www.safefoodonline.com/Uploads/Ochratoxin_Group.pdf
51. The Trichothecenes group. <http://www.safefoodonline.com/uploads/TrichothecenesTypeAGroup.pdf>; <http://www.safefoodonline.com/uploads/TrichothecenesTypeBGroup.pdf>; http://www.safefoodonline.com/uploads/zearalenone_group.pdf
52. Third Joint FAO/WHO/UNEP. International Conference on Mycotoxins. Tunis, Tunisia, 3-6 March 1999
53. Updated opinion of the Scientific Committee on Food on Fumonisin B1, B2 and B3 (expressed on 4 April 2003). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out185_en.pdf
54. Updated opinion of the Scientific Committee on Food on Fumonisin B1, B2 and B3. April 2003

Alguns *netsites* onde se pode encontrar informação útil e actual sobre este tema:

- www.fda.gov – Food and Drug Administration
- www.fao.org – Food and Agriculture Organization das Nações Unidas
- www.mycotoxicology.org – Mycotoxicology newsletter
- www.mycotoxin.de – Society for Mycotoxin Research (em alemão)
- www.iupac.org – União Internacional da Química Aplicada e Pura

Quadro I - Toxicidade e efeitos biológicos de algumas micotoxinas encontradas em alimentos

Mycotoxin	Major Foods	Common producing spp.	Biological activity	LD ₅₀ (mg kg ⁻¹)
Aflatoxins	Maize, groundnuts, figs, tree nuts (Aflatoxin M ₁ (secreted by cow after metabolism of Afl B ₁) Milk, milk products)	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Hepatotoxic, carcinogenic	0.5 (dog), 9.0 (mouse)
Cyclopiazonic acid	Cheese, maize, groundnuts, Rodo millet	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Convulsions	36 (rat)
Deoxynivalenol	Cereals	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Vomiting, feed refusal	70 (mouse)
T-2 toxin	Cereals	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Alimentary toxic aleukia	4 (rat)
Ergotamine	Rye	<i>Claviceps purpurea</i>	Neurotoxin	-
Fumonisin	Maize	<i>Fusarium moniliforme</i>	Equine encephalomalacia pulmonary oedema in pigs oesophageal carcinoma	?
Ochratoxin	Maize, cereals, coffee beans	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Nephrotoxic	20–30 (rat)
Patulin	Apple juice, damaged pomme fruits	<i>Penicillium expansum</i>	Oedema, haemorrhage possibly carcinogenic	35 (mouse)
Penitrem A	Walnuts	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Tremorgen	1.05 (mouse)
Sterigmatocystin	Cereals, coffee beans, cheese	<i>Aspergillus versicolor</i>	Hepatotoxic, carcinogenic	166 (rat)
Tenuazonic acid	Tomato paste	<i>Alternaria tenuis</i>	Convulsions, haemorrhage	81 (female mouse) 186 (male mouse)
Zearalenone	Maize, barley, wheat	<i>Fusarium graminearum</i>	Oestrogenic	not acutely toxic

In Basic Food Safety for Health Workers

Quadro II - *Algumas das micotoxinas mais comuns e os organismos que as produzem*

Micotoxina	Organismo
Acetoxyscirpenediol	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Acetyldeoxynivalenol	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Acetylneosolaniol	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Acetyl T-2 toxin	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Aflatoxin	<i>Aspergillus flavus, A. parasiticus</i>
Aflatrem	<i>Aspergillus flavus</i>
Altenuic acid	<i>Alternaria alternata</i>
Alternariol	<i>Alternaria alternata</i>
Austdiol	<i>Aspergillus ustus</i>
Austamide	<i>Aspergillus ustus</i>
Austocystin	<i>Aspergillus ustus</i>
Avenacein +1	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Beauvericin +2	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Bentenolide	<i>Monographella nivalis</i>
Brevianamide	<i>Aspergillus ustus</i>
Butenolide	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Calonectrin	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Chaetoglobosin	<i>Chaetomium globosum</i>
Citrinin	<i>Aspergillus carneus, A. terreus, Penicillium citrinum, P. hirsutum, P. Verrucosum</i>
Citreoviridin	<i>Aspergillus terreus, Penicillium citreoviride</i>
Cochliodinol	<i>Chaetomium cochliodes</i>
Crotocin	<i>Acremonium crotocinigenum</i>
Cytochalasin E	<i>Aspergillus clavatus</i>
Cyclopiazonic acid	<i>Aspergillus versicolor</i>
Deacetylcalonectrin	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Deoxynivalenol diacetate	<i>Fusarium moniliforme, and F. nivale</i>
Deoxynivalenol monoacetate	<i>Fusarium moniliforme, F. culmorum, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Diacetoxyscirpenol	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti</i>

Destruxin B	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Enniatins	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. solani</i> , and <i>F. nivale</i>
Fructigenin +1	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , and <i>F. roseum</i>
Fumagilin	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Fumonisin B1	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , and <i>F. nivale</i>
Fusaric acid	<i>Fusarium moniliforme</i>
Fusarin	<i>Fusarium moniliforme</i>
Gliotoxin	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium</i>
HT-2 toxin	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , and <i>F. nivale</i>
Ipomeanine	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , and <i>F. nivale</i>
Islanditoxin	<i>Penicillium islandicum</i>
Lateritin +1	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , and <i>F. nivale</i>
Lycomarasmin +1	<i>Fusarium moniliforme</i>
Malformin	<i>Aspergillus niger</i>
Maltoryzine	<i>Aspergillus spp.</i>
Moniliformin	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. roseum</i> , and <i>F. nivale</i>
Monoacetoxyscirpenol	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. roseum</i> , and <i>F. nivale</i>
Neosolaniol	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , and <i>F. roseum</i>
Nivalenol	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. roseum</i> , and <i>F. nivale</i>
NT-1 toxin	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. roseum</i> , and <i>F. nivale</i>
NT-2 toxin	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F.</i> , <i>F. solani</i> , <i>avenaceum</i> , <i>F. roseum</i> , and <i>F. nivale</i>
Ochratoxin	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium viridictum</i>
Oxalic acid	<i>Aspergillus niger</i>
Patulin	<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis</i> , <i>P. roquefortii</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. griseofulvum</i>
Penicillic acid	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Penitrem	<i>Penicillium crustosum</i>
Roridin E	<i>Myrothecium roridum</i> , <i>M. verrucaria</i> , <i>Dendrodochium spp.</i> , <i>Cylindrocarpon spp.</i> , <i>Stachybotrys spp.</i>
Rubratoxin	<i>Penicillium rubrum</i>
Rubroskyrin	<i>Penicillium spp.</i>
Rubrosulphin	<i>Penicillium viridicatum</i>
Rugulosin	<i>Penicillium brunneum</i> , <i>P. kloeckeri</i> , <i>P. rugulosum</i>

Sambucynin +1	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. solani, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Satratoxins, F,G,H	<i>Stachybotrys chartarum, Trichoderma viridi</i>
Scirpentriol	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. solani, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Slaframine	<i>Rhizoctonia leguminicola</i>
Sterigmatocystin	<i>Aspergillus flavus, A. nidulans, A. versicolor, Penicillium rugulosum</i>
T-1 toxin	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. culmorum, F. solani, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
T-2 toxin	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. culmorum, F. solani, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Triacetoxyscirpendiol	<i>Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. avenaceum, F. roseum, and F. nivale</i>
Trichodermin	<i>Trichoderma viride</i>
Trichothecin	<i>Trichothecium roseum</i>
Trichoverrins	<i>Stachybotrys chartarum</i>
Trichoverrols	<i>Stachybotrys chartarum</i>
Tryptequivalene	<i>Aspergillus clavatus</i>
Verrucarín	<i>Myrothecium verrucaria, Dendrodochium spp., Stachybotrys chartarum</i>
Verrucologen	<i>Aspergillus fumigatus, Stachybotrys chartarum</i>
Viopurpurin	<i>Trichophyton spp., Penicillium viridicatum</i>
Viomellein	<i>Aspergillus spp., Penicillium aurantiogriseum, P. crustosum, P. viridicatum</i>
Viriditoxin	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Xanthocillin	<i>Eurotium chevalieri</i>
Yavanicin +1	<i>Fusarium culmorum, F. graminearum, F. oxysporum, F. roseum, F. moniliforme, F. avenaceum, F. equiseti, and F. nivale</i>
Zearalenone	<i>Fusarium culmorum, F. graminearum, F. oxysporum, F. roseum, F. moniliforme, F. avenaceum, F. equiseti, and F. nivale</i>

(adaptado de <http://mold-help.org>, Oct. 2004)

Quadro III - *Alguns efeitos tóxicos de algumas micotoxinas*

Micotoxina	Efeito
Aflatoxina B1	Carcinogénica, hepatotóxica, danos no DNA
Toxinas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	Tremorgénica, hemorragia, muitos outros
Esterigmatocistina	Carcinogénica, danos no fígado
Ocratoxina A	Carcinogénica, nefrotóxica, teratogénica
Citrinina	Nefrotóxica
Zearalenona	Estrogénica
Patulina	Carcinogénica?, edema pulmonar, hemorragia
Alcalóides de Ergot	Gangrena, redução da fertilidade
Tricotecenos	Hemorragia, diarreia, dermatites, falta de apetite
Satratoxinas	Necroses, <i>scouring</i> , rinites
Penitrem A	<i>Tremorgenica</i>
Toxinas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	Hemorragia, diarreia, tremorgénica
Ácido Tenuazónico	Hemorragia, convulsões, anorexia
Alternariol	Citotóxica, fetotóxica
Esporidesmina	Fotosensibilização, doenças no fígado
Xanthomegnin and viomellein	Fotosensibilização, Danos no fígado e nos rins?
Toxina PR	Danos no fígado e nos rins, mutagénica?
Gliotoxina	<i>Hematuria, anti-varal immunosuppressant?</i>
Lolitrem B	<i>Staggers</i>

In Keith A Scudamore¹ and Christopher T Livesey “Occurrence and Significance of Mycotoxins in Forage Crops and Silage: a Review”
J Sci Food Agric 1998, 77, 1-17

5.3 LEGISLAÇÃO (consultada)

5.3.1 Legislação comunitária

1. [Regulamento \(CE\) n.º 856/2005](#) da Comissão, de 6 de Junho de 2005, que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no que diz respeito às **toxinas de *Fusarium***. *JO L 143 de 07/06/2005 p. 0003-0008*
2. [Directiva 2005/38/CE](#) da Comissão, de 6 de Junho de 2005, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de **toxinas de *Fusarium*** nos géneros alimentícios. *JO L 143 de 07/06/2005 p. 0018-0026*
3. [Directiva 2005/5/CE](#) da Comissão, de 26 de Janeiro de 2005, que altera a Directiva 2002/26/CE no que respeita aos métodos de colheita de amostras e aos métodos de análise para o controlo oficial dos teores de **ocratoxina A** nos géneros alimentícios. *JO L 027 de 29/01/2005 p. 0038-0040*
4. [Directiva 2004/43/CE](#) da Comissão, de 13 de Abril de 2004, que altera a Directiva 98/53/CE e a Directiva 2002/26/CE no que diz respeito aos métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial dos teores de **aflatoxina** e de **ocratoxina A** nos géneros alimentícios destinados a lactentes e crianças jovens. *JO L 113 de 20/04/2004 p. 0014 – 0016*
5. [Regulamento \(CE\) n.º 683/2004](#) da Comissão, de 13 de Abril de 2004, que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no que diz respeito às **aflatoxinas** e à **ocratoxina A** nos alimentos destinados a lactentes e a crianças jovens. *JO L 106 de 15/04/2004 p. 0003-0005*
6. [Regulamento \(CE\) n.º 455/2004](#) da Comissão, de 11 de Março de 2004, que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no respeitante à **patulina**. *JO L 074 de 12/03/2004 p. 0011*
7. [Directiva 2003/121/CE](#) da Comissão, de 15 de Dezembro de 2003, que altera a Directiva 98/53/CE que fixa os métodos de colheita de amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes nos géneros alimentícios. *JO L 332 de 19/12/2003 p. 0038 - 0040*
8. [Regulamento \(CE\) n.º 2174/2003](#) da Comissão, de 12 de Dezembro de 2003, que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no respeitante às **aflatoxinas**. *JO L 326 de 13/12/2003 p. 0012 – 0015*
9. [Directiva 2003/78/CE](#) da Comissão, de 11 de Agosto de 2003, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial do teor de **patulina** nos géneros alimentícios. *JO L 203 de 12/08/2003 p. 0040 – 0044*
10. [Recomendação \(2003/598/CE\)](#) da Comissão de 11 de Agosto de 2003, relativa à prevenção e redução da contaminação por **patulina** do sumo de maçã e dos ingredientes do sumo de maçã noutras bebidas [notificada com o número C(2003) 2866]. *JO L 203 de 12/08/2003 p. 0054 – 0059*
11. [Regulamento \(CE\) n.º 1425/2003](#) da Comissão, de 11 de Agosto de 2003, que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no respeitante à **patulina**. *JO L 203 de 12/08/2003 p. 0001 – 0003*
12. [Directiva 2002/27/CE](#) da Comissão, de 13 de Março de 2002, que altera a Directiva 98/53/CE, que fixa os métodos de colheita de amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes nos géneros alimentícios. *JO L 075 de 16/03/2002 p. 0044 – 0045*

13. [Directiva 2002/26/CE](#) da Comissão, de 13 de Março de 2002, que fixa os métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial do teor de **ocratoxina A** nos géneros alimentícios. *JO L 075 de 16/03/2002 p. 0038 – 0043*
14. [Regulamento \(CE\) n.º 472/2002](#) da Comissão, de 12 de Março de 2002, que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *JO L 075 de 16/03/2002 p. 0018 – 0020*
15. [Regulamento \(CE\) N.º 257/2002](#) da Comissão, de 12 de Fevereiro de 2002 que altera o Regulamento (CE) n.º 194/97 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, e o Regulamento (CE) n.º 466/2001 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *JO L 041 de 13/02/2002 p. 0012 – 0015*
16. [Regulamento \(CE\) n.º 466/2001](#) da Comissão, de 8 de Março de 2001, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros. *JO L 077 de 16/03/2001 p. 0001 – 0013*
17. [Directiva 98/53/CE](#) da Comissão de 16 de Julho de 1998 que fixa os métodos de colheita de amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes nos géneros alimentícios. *JO L 201 de 17/07/1998 p. 0093 – 0101*
18. [Regulamento \(CE\) n.º 1525/98](#) da Comissão de 16 de Julho de 1998 que altera o Regulamento (CE) n.º 194/97 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *JO L 201 de 17/07/1998 p. 0043 – 0046*
19. [Decisão 97/747/CE](#) da Comissão de 27 de Outubro de 1997 que fixa o nível e a frequência de amostragem previstos pela Directiva 96/23/CE do Conselho para a pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos em certos produtos de origem animal. *JO L 303 de 06/11/1997 p. 0012 – 0015*
20. [Regulamento \(CE\) n.º 194/97](#) de 31 de Janeiro de 1997 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *JO L 031 de 01/02/1997 p. 0048 – 0050*
21. [Directiva 96/23/CE](#) do Conselho, de 29 de Abril de 1996, relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos e que revoga as Directivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE. *JO L 125 de 23/05/1996 p. 0010 – 0032*
22. [Directiva 94/40/CE](#) da Comissão de 22 de Julho de 1994 que altera os anexos da Directiva 87/153/CEE do Conselho que fixa linhas directrizes para a avaliação dos aditivos na alimentação para animais. *JO L 208 de 11/08/1994 p. 0015 – 0026*
23. [Regulamento \(CEE\) n.º 315/93](#) do Conselho, de 8 de Fevereiro de 1993, que estabelece procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *JO L 037 de 13/02/1993 p. 0001 – 0003*
24. [Directiva 87/153/CEE](#) do Conselho de 16 de Fevereiro de 1987 que fixa linhas directrizes para a avaliação dos aditivos na alimentação para animais. *JO L 064 de 07/03/1987 p. 0019 – 0028*
25. [Directiva 83/228/CEE](#) do Conselho, de 18 de Abril de 1983, que diz respeito à fixação de linhas directrizes para a avaliação de certos produtos utilizados na alimentação dos animais. *JO L 126 de 13/05/1983 p. 0023 - 0027 Edição especial portuguesa: Capítulo 03 Fascículo 27 p. 0184*
26. [Sétima Directiva 76/372/CEE](#) da Comissão, de 1 de Março de 1976, que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais. *JO L 102 de 15/04/1976 p. 0008 – 0018*

5.3.2 Legislação nacional (Portuguesa)

1. [Decreto-Lei n.º 50/2006](#) de 2 de Março
Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
Transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 2005/38/CE, da Comissão, de 6 de Junho, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de **toxinas *Fusarium*** nos géneros alimentícios (*D.R. n.º 44/2006 SÉRIE I-A de 2006-03-02 páginas 1654 a 1658*)
2. [Decreto-Lei n.º 8/2006](#) de 4 de Janeiro
Ministério da Saúde
Transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 2004/43/CE, da Comissão, de 13 de Abril, que diz respeito aos métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial dos teores de **aflatoxina** e de **ocratoxina A** nos géneros alimentícios destinados a lactentes e crianças jovens, e altera os Decretos-Leis n.os 110/2001, de 6 de Abril, e 72-J/2003, de 14 de Abril (*D.R. n.º 3/2006 SÉRIE I-A de 2006-01-04 páginas 73 a 75*)
3. [Decreto-Lei n.º 189/2005](#) de 4 de Novembro
Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
Transpõe para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 2005/5/CE, da Comissão, de 26 de Janeiro, que altera a Directiva n.º 2002/26/CE, da Comissão, de 13 de Março, que fixa os métodos de colheita de amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de **ocratoxina A** nos géneros alimentícios, e altera o Decreto-Lei n.º 72-J/2003, de 14 de Abril (*D.R. n.º 212/2005 SÉRIE I-A de 2005-11-04 páginas 6316-6318*)
4. [Decreto-Lei n.º 133/2004](#) de 3 de Junho
Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas
Transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º [2003/121/CE](#), da Comissão, de 15 de Dezembro, que altera a Directiva n.º [98/53/CE](#), que fixa os métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes nos géneros alimentícios (*D.R. n.º 130/2004 SÉRIE I-A de 2004-06-03 páginas 3487 a 3489*)
5. [Decreto-Lei n.º 126/2004](#) de 31 de Maio
Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas
Transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 2003/78/CE, da Comissão, de 11 de Agosto, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial do teor de **patulina** nos géneros alimentícios (*D.R. n.º 127/2004 SÉRIE I-A de 2004-05-31 páginas 3411 a 3414*)
6. [Decreto-Lei n.º 72-I/2003](#) de 14 de Abril
Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas
Transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 2002/26/CE, da Comissão, de 13 de Março, que fixa os métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial do teor da **ocratoxina A** nos géneros alimentícios (*D.R. n.º 88/2003 SÉRIE I-A, 1º Suplemento de 2003-04-14 páginas 2452-(114) a 2452-(117)*)
7. [Decreto-Lei n.º 72-I/2003](#) de 14 de Abril
Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas
Altera o Decreto-Lei n.º 110/2001, de 6 de Abril, transpondo para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 2002/27/CE, da Comissão, de 13 de Março, que altera a Directiva n.º 98/53/CE, da Comissão, de 16 de Julho, que fixa os métodos de colheita

- de amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes nos géneros alimentícios (D.R. n.º 88/2003 SÉRIE I-A, 1º Suplemento de 2003-04-14 páginas 2452-(112) a 2452-(113))
8. [Decreto-Lei n.º 110/2001](#) de 6 de Abril
Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
Transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 98/53/CE, da Comissão, de 16 de Julho, relativa à aproximação das legislações dos Estados membros sobre os métodos de colheitas e amostras e os métodos de análise para o controlo oficial dos teores de certos contaminantes (**afatoxinas**) nos géneros alimentícios (D.R. n.º 82/2001 SÉRIE I-A de 2001-04-06 páginas 2041 a 2046)
 9. [Decreto-Lei n.º 148/99](#) de 4 de Maio
Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
Transpõe para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 96/23/CE, do Conselho, de 29 de Abril, relativa às medidas de controlo a aplicar a certos subprodutos e aos seus resíduos em animais vivos e respectivos produtos (D.R. n.º 103/99 SÉRIE I-A de 1999-05-04 páginas 2354 a 2370)
 10. [Portaria n.º 69/97](#) de 29 de Janeiro
Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
Aprova as linhas directrizes para a avaliação dos aditivos na alimentação para animais.
Revoga a Portaria n.º 1104/89, de 27 de Dezembro (D.R. n.º 24/97 SÉRIE I-B de 1997-01-29 páginas 487 a 494)
 11. [Portaria n.º 62/97](#) de 25 de Janeiro
Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
Altera o anexo I da Portaria n.º 1107/89, de 27 de Dezembro, com a redacção que lhe foi introduzida pela Portaria n.º 1208/91, de 19 de Dezembro (D.R. n.º 21/97 SÉRIE I-B de 1997-01-25 página 435)
 12. [Portaria n.º 16/97](#) de 4 de Janeiro
Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
Aprova o método oficial de análise a utilizar para a determinação do teor de **afatoxina B** nos alimentos para animais (D.R. n.º 3/97 SÉRIE I-B de 1997-01-04 páginas 33 a 41)
 13. [Portaria n.º 1208/91](#) de 19 de Dezembro
Ministério da Agricultura
Altera o anexo I da Portaria n.º 1107/89, de 27 de Dezembro, que aprova a lista de substâncias e produtos indesejáveis nos alimentos simples, matérias-primas e alimentos compostos destinados à alimentação animal e respectivos teores máximos admissíveis (D.R. n.º 292/91 SÉRIE I-B de 1991-12-19 página 6695)
 14. [Portaria n.º 1107/89](#) de 27 de Dezembro
Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação
Aprova a lista de substâncias e produtos indesejáveis nos alimentos e respectivos teores máximos admissíveis (D.R. n.º 296/89 SÉRIE I de 1989-12-27 páginas 5585-5589)
 15. [Portaria n.º 1104/89](#) de 27 de Dezembro
Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação
Estabelece as linhas directrizes para a avaliação dos aditivos destinados à alimentação animal (D.R. n.º 296/89 SÉRIE I de 1989-12-27 páginas 5570 a 5573)
 16. [Decreto-Lei n.º 6/83](#), de 14 de Janeiro
Ministérios dos Assuntos Sociais e da Agricultura, Comércio e Pescas
Estabelece os limites máximos de **afatoxinas** nos alimentos para consumo humano (D.R. n.º 11/83 SÉRIE I de 1983-01-14 páginas 74 a 75)

17. [Portaria n.º 671/73](#) de 8 de Outubro

Ministério da Economia - Secretarias de Estado do Comércio e da Indústria

Fixa os limites máximos de [aflatoxinas](#) permitidas nos alimentos simples e compostos utilizados como ração de animais (*D.R. n.º 235/73 SÉRIE I de 1973-10-08 páginas 1761 a 1762*)

5.3.3 **Legislação geral**

1. [Recomendação 2005/175/CE](#) da Comissão, de 1 de Março de 2005, relativa a um programa coordenado de controlo oficial dos géneros alimentícios para 2005. *JO L 059 de 05/03/2005 p. 0027 – 0039*
2. [Rectificação ao Regulamento \(CE\) n.º 852/2004](#) do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. *JO L 226 de 25/06/2004 p. 0003 – 0021*
3. [Regulamento \(CE\) n.º 852/2004](#) do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. *JO L 139 de 30/04/2004 p. 0001 - 0054*
4. [Recomendação da Comissão](#), de 17 de Fevereiro de 2004, relativa ao programa coordenado de controlo no domínio da alimentação animal para 2004, nos termos da Directiva 95/53/CE do Conselho. *JO L 052 de 21/02/2004 p. 0070 – 0076*
5. [Recomendação da Comissão](#), de 19 de Dezembro de 2003, relativa a um programa coordenado de controlo oficial dos géneros alimentícios para 2004 [notificada com o número C(2003) 4878]. *JO L 006 10/01/2004 p. 0029 - 0037*
6. [Directiva 2003/100/CE](#) da Comissão, de 31 de Outubro de 2003, que altera o anexo I da Directiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais. *JO L 285 de 01/11/2003 p. 0033 - 0037*
7. [Decisão 2003/580/CE](#) da Comissão, de 4 de Agosto de 2003, que altera a Decisão 2000/49/CE que revoga a Decisão 1999/356/CE e impõe condições especiais à importação de amendoins e de determinados produtos derivados do amendoim, originários ou provenientes do Egipto [notificada com o número C(2003) 2800] *JO L 197 de 05/08/2003 p. 0031 – 0034*
8. [Decisão 2003/552/CE](#) da Comissão, de 22 de Julho de 2003, que altera a Decisão 2002/80/CE que impõe condições especiais à importação de figos, avelãs e pistácios e de determinados produtos derivados, originários ou provenientes da Turquia [notificada com o número C(2003) 2604]. *JO L 187 de 26/07/2003 p. 0047 – 0050*
9. [Decisão 2003/551/CE](#) da Comissão, de 22 de Julho de 2003, que altera a Decisão 97/830/CE que revoga a Decisão 97/613/CE da Comissão e impõe condições especiais à importação de pistácios e de certos produtos derivados dos pistácios originários ou provenientes do Irão [notificada com o número C(2003) 2603]. *JO L 187 de 26/07/2003 p. 0043 – 0046*
10. [Decisão 2003/550/CE](#) da Comissão, de 22 de Julho de 2003, que altera a Decisão 2002/79/CE que impõe condições especiais à importação de amendoins e de determinados produtos derivados do amendoim, originários ou provenientes da China [notificada com o número C(2003) 2602]. *JO L 187 de 26/07/2003 p. 0039 – 0042*
11. [Decisão 2002/836/CE](#) do Conselho de 30 de Setembro de 2002 que adopta o programa específico de investigação, desenvolvimento tecnológico e demonstração a executar por meio de acções directas pelo Centro Comum de Investigação (2002-2006). *JO L 294 de 29/10/2002 p. 0060 – 0073*

12. [Decisão 2002/678/CE](#) da Comissão, de 22 de Agosto de 2002, que altera a Decisão 2002/79/CE que impõe condições especiais à importação de amendoins e de determinados produtos derivados do amendoim, originários ou provenientes da China [notificada com o número C(2002) 3108]. *JO L 229 de 27/08/2002 p. 0033 – 0036*
13. [Decisão 2002/233/CE](#) da Comissão, de 20 de Março de 2002, que altera e rectifica a Decisão 2002/79/CE que impõe condições especiais à importação de amendoins e de determinados produtos derivados do amendoim, originários ou provenientes da China e a Decisão 2002/80/CE que impõe condições especiais à importação de figos, avelãs e pistácios e de determinados produtos derivados, originários ou provenientes da Turquia [notificada com o número C(2002) 1187]. *JO L 078 de 21/03/2002 p. 0014 – 0019*
14. [Recomendação](#) da Comissão, de 12 de Março de 2002, relativa aos programas coordenados de controlo no domínio da alimentação animal para 2002, nos termos da Directiva 95/53/CE do Conselho [notificada com o número C(2002) 546]. *JO L 070 de 13/03/2002 p. 0020 – 0022*
15. [Decisão 2002/80/CE](#) da Comissão, de 4 de Fevereiro de 2002, que impõe condições especiais à importação de figos, avelãs e pistácios e de determinados produtos derivados, originários ou provenientes da Turquia [notificada com o número C(2002) 386]. *JO L 034 de 05/02/2002 p. 0026 – 0030*
16. [Decisão 2002/79/CE](#) da Comissão, de 4 de Fevereiro de 2002, que impõe condições especiais à importação de amendoins e de determinados produtos derivados do amendoim, originários ou provenientes da China [notificada com o número C(2002) 385]. *JO L 034 de 05/02/2002 p. 0021 - 0025*
17. [Regulamento \(CE\) n.º 178/2002](#) do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. *JO L 031 de 01/02/2002 p. 0001 – 0024*

Tabela I - Efeitos tóxicos das Aflatoxinas em humanos - Ocorrência de aflatoxicoses (Peraica et al., 1999)

Country	No. of subjects	Symptoms and signs	Exposure			Material analysed	Toxin	Liver histopathology	Reference
			Source	Duration	Toxin				
Uganda	1; 1 ^a	Abdominal pain, oedema of legs, palpable liver on ECG prolongation of P-R interval, right bundle branch block	Cassava	5-30 days	Aflatoxin 1.7 ppm	--	--	Centrilobular necrosis polymorphonuclear infiltration and fibrin in sinusoids, fatty changes in midzonal region	24
India	397; 106	Brief febrile episode, vomiting, anorexia jaundice, ascites, oedema of legs, massive gastrointestinal bleeding	Maize	Several weeks	Aflatoxin B1 (5/5) ^b 6.25-15.6 ppm	Serum	Aflatoxin B1 (2/7)	Bile duct proliferation with periductal fibrosis, multinucleated giant cells, foamy cytoplasm, bile stasis in bile ducts, dilated biliary canaliculi	25
			Maize	--	Aflatoxin B1 (7/70) ^c < 0.1 ppm	Urine	Aflatoxin B1 (0/7)		26
India	994; 97	Fever, vomiting, oedema of feet, jaundice, hepatomegaly, ascites, splenomegaly	Maize	--	Aflatoxin B1 (13/14) 0.01-1.1 ppm	--	--	Cholangiolar proliferation, perivenous collagenosis, luminal obliteration, extensive fibrosis, giant cell transformation of hepatocytes, moderate to severe cholestasis and proliferation of cholangioles	27
Kenya	20; 12	Brief febrile episode, vomiting, abdominal discomfort, anorexia, jaundice, oedema of legs, ascites, tachycardia, tenderness of liver (rarely enlarged), melaena, gastrointestinal bleeding	Maize	Several weeks	Aflatoxin B1 (2/2) 3.2-12 ppm aflatoxin B2 (2/2) 1.6-2.7 ppm	Liver (autopsy)	Aflatoxin B1 (2/2)	Marked centrilobular necrosis, slight fatty infiltration, and no proliferation of bile ducts	28
USA	1; 0	Non-pruritic macular rash, nausea, headache	Purified aflatoxin B1	2 days	Aflatoxin B1 5.5 mg ^d	--	--	Normal	29
		Nausea	Purified Aflatoxin B1	2 weeks	aflatoxin B1 35 mg ^d	Urine	Aflatoxin M1 (0/1) ^e	Normal	

^a Figures in bold are the number of deaths.

^b Figures in parentheses are number positive/number analysed.

^c Maize samples taken from the affected families one year after the outbreak.

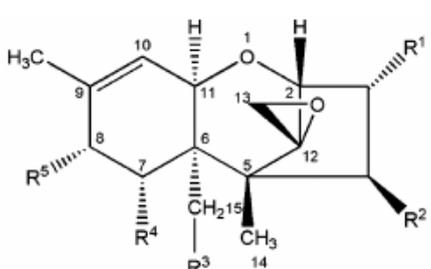
^d Total dose.

^e Three days after ingestion of purified aflatoxin B1.

24. Serck-Hanssen A. Aflatoxin-induced fatal hepatitis? A case report from Uganda. Archives of environmental health, **1970**, 20: 729-731.
25. Krishnamachari KAVR et al. Hepatitis due to aflatoxicosis. Lancet, **1975**, 1061-1063.
26. Bhat RV, Krishnamachari KAVR. Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of western India. Indian journal of medical research, **1977**, 66: 55-58.
27. Tandon BN et al. Study of an epidemic of jaundice, presumably due to toxic hepatitis, in Northwest India. Gastroenterology, **1977**, 72: 488-494.
28. Ngindu A. et al. Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. Lancet, **1982**, 1346-1348.
29. Willis RM, Mulvihill JJ, Hoofnagle JH. Attempted suicide with purified aflatoxin. Lancet, **1980**, 1198-1199.

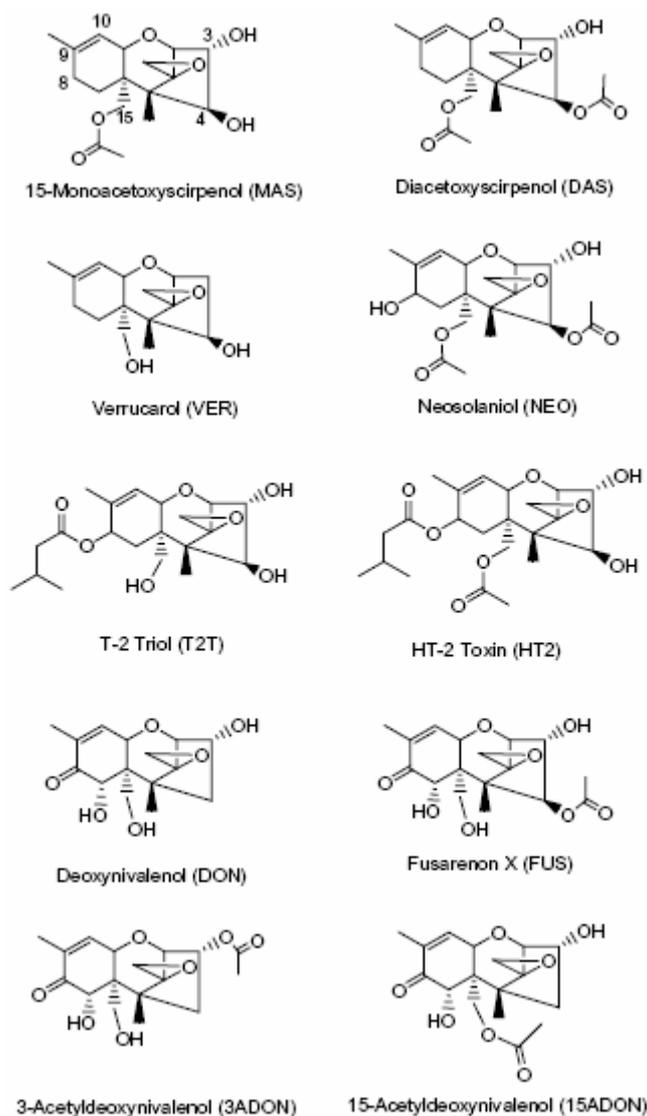
Nas figuras seguintes estão representadas as estruturas de alguns tricotecenos.

Figura A – Fórmulas de estruturas de tricotecenos do tipo A e do tipo B (Klotzel et al., 2005)



Trichothecene	MW	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Type A						
Neosolaniol (1)	382	OH	OAc	OAc	H	OH
HT-2 toxin (HT-2) (2)	424	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 toxin (T-2) (3)	466	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 triol (4)	382	OH	OH	OH	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 tetraol (5)	298	OH	OH	OH	H	OH
Monoacetoxyscirpenol (6)	324	OH	OH	OAc	H	H
Diacetoxyscirpenol (7)	366	OH	OAc	OAc	H	H
Type B						
Deoxynivalenol (8)	296	OH	H	OH	OH	=O
3-Acetyl-DON (9)	338	OAc	H	OH	OH	=O
15-Acetyl-DON (10)	338	OH	H	OAc	OH	=O
Nivalenol (11)	312	OH	OH	OH	OH	=O
Fusarenon-X (12)	354	OH	OAc	OH	OH	=O

Figura B – Estruturas químicas de alguns tricotecenos (Young et al., 2006)



Lista de fornecedores de padrões de micotoxinas

Diffchamb: <http://www.diffchamb.com/website/ARCHIVE/TEMPLATES/main.asp>

ELISA-technologies: <http://www.elisa-tek.com/home.htm>

International Diagnostic Systems Corp.: <http://www.ids-kits.com/mycot.html>

MedTox: www.medtox.com/agri.html

Neogen: <http://www.neogen.com/>

R-Biopharm: <http://www.r-biopharm.com/general/main.php>

Romer Labs: <http://www.romerlabs.com/news2004.html>

Tepnel: <http://www.tepnel.com/>

Vicam Co.: www.vicam.com

Kits Teste para algumas micotoxinas em <http://www.aoac.org/testkits/kits-toxins.htm>

Morada de alguns fornecedores de padrões de micotoxinas

Aldrich Chemical Co Ltd The Old Brickyard New Road Gillingham Dorset SP 8 4JL UK	C.P. Laboratories Ltd (Calbiochem) PO Box 22 Bishops Stortford Herts CM22 7RQ UK	Makor Chemicals Ltd P.O.B. 6570 Jerusalem 91060 Israel
Pfaltz and Bauer, Inc., 375 Fairfield Avenue Stamford Connecticut 06902 USA	Phase Separations Ltd Deeside Industrial Estate Queensferry Clwyd CH5 2LR UK	Pierce and Warriner (UK) Ltd 44 Upper Northgate Street Chester Cheshire CH1 4EF UK
Sigma Chemical Co Ltd Fancy Road Poole Dorset BH17 7NH UK	Sigma Chemical Co PO Box 14508 St Louis Missouri 63178 USA	Uniscience Ltd Uniscience House 8 Jesus Lane Cambridge CB5 8BA UK