

PREVENÇÃO E CONTROLE DE MICOTOXINAS



Micotoxinas são compostos químicos venenosos produzidos por alguns fungos. A presença de micotoxinas em grãos e outros gêneros alimentícios de primeira necessidade tem sérias implicações para a saúde humana e animal. A prevenção da invasão de fungos nos produtos de base é o mais eficaz método para evitar problemas de micotoxinas.

MICOTOXINAS DEFINIÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos que crescem em cereais no campo, durante sua colheita e armazenagem. Elas entram no sistema de produção animal através do alimento (concentrado, silagem ou feno) ou da cama. As micotoxinas têm um efeito negativo sobre o desempenho, a saúde e a qualidade dos produtos dos animais. Sendo assim, o controle de micotoxinas é essencial em termos de rentabilidade da produção, bem-estar animal, qualidade dos produtos, e segurança alimentar.

As micotoxinas são diferentes quimicamente, com representantes em várias famílias e com um peso molecular que varia de 200 a 500 kD. Existem centenas de micotoxinas conhecidas, mas poucas foram extensivamente estudadas, e menos ainda possuem métodos de análise disponíveis. As micotoxinas apresentam uma grande variedade quanto à gravidade de seus efeitos sobre os animais.

A história das micotoxinas começou em 1960, quando um surto de mortes inexplicáveis de aves no Reino Unido (especialmente perus) foi investigado. O surto ficou mundialmente conhecido como *turkey X disease*. Chegou-se à conclusão que o problema estava na ração, que havia sido feita com amendoim contaminado com uma substância fluorescente produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*. Da expressão inglesa *A. flavus toxin* derivou a palavra aflatoxina. Hoje se sabe que não existe uma aflatoxina, mas pelo menos 17 compostos tóxicos, dentre os quais os mais importantes são as aflatoxinas B₁, G₁, B₂ e G₂. E destas, a aflatoxina B₁ (AFB₁) é considerada o agente natural mais carcinogênico que se conhece. Por conta disso e pela prevalência deste fungo (e de outras espécies produtoras), é a mais importante micotoxina no Brasil.

A partir de 1962, quando se estabeleceu as causas do surto, pesquisas subsequentes encontraram outros fungos produtores de substâncias tóxicas diferentes. Uma visão geral das mais importantes micotoxinas pode ser vista na Tabela 1.

TABELA 1 - PRINCIPAIS MICOTOXINAS COM SEUS RESPECTIVOS FUNGOS PRODUTORES, SUBSTRATOS E EFEITOS NO HOMEM E NOS ANIMAIS

Principais substratos	Principais fungos produtores	Principal toxina	Efeitos
Amendoim, milho.	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B ₁	Hepatotóxica, nefrotóxica, carcinogênica.
Trigo, aveia, cevada, milho e arroz.	<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina	Nefrotóxica para suínos.
Centeio e grãos em geral.	<i>Claviceps purpurea</i>	Ergotamina	Gangrena de extremidades ou convulsões.
Milho.	<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisinias	Câncer de esôfago.
Cevada, café, vinho.	<i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i>	Ocratoxina	Hepatotóxica, nefrotóxica, carcinogênica.
Frutas e sucos de frutas.	<i>Penicillium expansum</i> e <i>Penicillium griseofulvum</i>	Patulina	Toxicidade vagamente estabelecida.
Milho, cevada, aveia, trigo, centeio.	<i>Fusarium sp</i> , <i>Myrothecium sp</i> , <i>Stachybotrys sp</i> , <i>Trichothecium sp</i>	Tricotecenos: T ₂ , neosolaniol, fusanona x, nivalenol, deoxivalenol.	Hemorragias, vômitos, dermatites.
Cereais.	<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona	Baixa toxicidade; síndrome de masculinização e feminização em suínos.

Os piores efeitos das micotoxinas no homem tendem a ser os crônicos, de difícil associação com o consumo de alimentos contaminados. Os principais efeitos registrados são indução de câncer, lesão renal e depressão do sistema imune.

O homem pode ser contaminado por micotoxinas através do consumo de alimentos processados ou *in natura*. Também pode ingerir carne de animais alimentados com ração contaminada, pois a toxina pode ser transmitida pelo corpo do animal através de sua carne, leite ou ovos. Alguns alimentos com contaminação potencial, como o milho, podem ter seus produtos derivados, como o óleo refinado, isento da toxina, pois há a destruição da mesma no processo de transformação do produto.

A legislação brasileira, através da resolução RDC N° 274, do Ministério da Saúde, datada de 15/10/2002, dispõe que alguns alimentos para o consumo humano, como o amendoim, o milho em grão e o leite, podem ter uma concentração máxima de 0,5ng/kg) de aflatoxina,

enquanto que a União Europeia permite teores de aflatoxina mais restritos para alguns alimentos comuns à nossa legislação, variando de 2 a 5ng/kg. Já a Instrução Normativa n°13 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de 27/05/2004, dispõe que se houver algum lote de mercadoria devolvida por importadores, ou por resultado de inspeção ou fiscalização, este poderá ser liberado para o consumo humano ou animal se o resultado da primeira análise for igual ou menor que o limite de 30 e 50 ng/kg.

MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

Um grande número de fungos produz substâncias tóxicas, sendo que algumas dessas substâncias possuem capacidade mutagênica e carcinogênica, enquanto outras apresentam toxicidade específica a um órgão ou são tóxicas por outros mecanismos.

Mesmo que a verdadeira toxicidade de muitas micotoxinas ainda não tenha

sido demonstrada para humanos, o efeito desses compostos em animais de laboratório e em ensaios *in vitro* deixa poucas dúvidas a respeito de sua toxicidade potencial. No mínimo, 14 micotoxinas são carcinogênicas, sendo as aflatoxinas as mais potentes. Como regra, aceita-se que 93% dos compostos mutagênicos são carcinogênicos. Com as micotoxinas, ensaios microbiológicos revelaram um nível de 85% de correlação entre carcinogenicidade e mutagenicidade.

A seguir são descritas as principais micotoxinas relacionadas à alimentos.

AFLATOXINA

As aflatoxinas são as micotoxinas mais amplamente estudadas. São conhecidas desde 1960, quando mais de 100 mil perus morreram na Inglaterra após ingerirem ração contendo amendoim importado da África e da América do Sul. A partir da ração que causou a morte dos animais, foram isolados *Aspergillus flavus* e uma toxina produzida por esse fungo, a qual foi designada aflatoxina (toxina do *Aspergillus flavus* - A-flatoxina).

Posteriormente, também foi verificado que *A. parasiticus*, *A. nominus* e outras espécies de *Aspergillus* produzem aflatoxinas. Quimicamente, as aflatoxinas são cumarinas altamente substituídas e, no mínimo, 18 toxinas intimamente relacionadas são conhecidas. A aflatoxina B₁ (AFB₁) é produzida por todas as linhagens produtoras de aflatoxinas, sendo a micotoxina mais potente dentro desse grupo. A AFM₁ é um produto hidroxilado da AFB₁, e aparece no leite, urina e fezes de animais como um produto metabólico. Outros derivados da AFB₁ são a AFL, AFLH₁, AFQ₁ e AFP₁. A AFB₂ é a forma 2,3-dihidro da AFB₁, enquanto que a AFG₂ é a forma 2,3-dihidro da AFG₁. A toxicidade das seis aflatoxinas mais potentes decresce na seguinte ordem: B₁ > M₁ > G₁ > B₂ > M₂ ≠ G₂. Quando observadas sob luz ultravioleta (UV), as micotoxinas B₁ e B₂ fluorescem na cor azul, as micotoxinas G₁ e G₂ na cor verde e verde-azulada, respectivamente, e as micotoxinas M₁ e M₂ na coloração azul-violeta e violeta, respectivamente.

As micotoxinas são metabólitos se-

cundários poliquetídeos, cuja estrutura carbônica é proveniente do acetato e do malonato. A rota metabólica parcial proposta para a síntese de AFB₁ é: acetato > ácido norsolorínico > averantina > averufanina > averufina > versiconal hemiacetal acetato > versicolorina A > esterigmatocistina > O-metilesterigmatocistina > AFB₁. O composto versicolorina A é o primeiro na rota que contém a dupla ligação essencial C₂-C₃.

De modo geral, os parâmetros mínimos e máximos que controlam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas não são fáceis de definir. Esse fato ocorre, em parte, devido à diversidade de ambientes que os fungos habitam na natureza e, também, por serem organismos eucarióticos propriamente ditos. Assim, fica claro que o crescimento pode ocorrer sem a produção de toxina.

A AFG₁ é produzida em temperaturas mais baixas de crescimento do que a AFB₁. Alguns pesquisadores têm encontrado maior produção de AFB₁ do que AFG₁ em temperaturas próximas a 30°C, enquanto outros têm observado produções equivalentes. Com relação a *A. flavus* e *A. parasiticus*, o primeiro geralmente produz somente AFB e AFG.

A aeração favorece a produção de aflatoxinas, e a quantidade de 2mg/g pode ser produzida em substratos naturais, como arroz, milho, soja e outros semelhantes. Em meios de cultura em caldo contendo níveis apropriados de Zn²⁺, podem ser produzidos até 200 ou 300mg/L de toxina.

Em alimentos, as aflatoxinas tem sido

encontradas em carne fresca, presunto e bacon, inoculados com culturas toxigênicas e estocados a 15°C, 20°C e 30°C.

As aflatoxinas também têm sido encontradas em uma ampla variedade de alimentos, incluindo leite, cerveja, chocolate, uva passa, produtos à base de soja, entre outros. Em linguiças fermentadas a 25°C, observou-se a produção de 160ppm e 426ppm de AFG, em um período de 10 e 18 dias, respectivamente, sendo a produção de AFG₁ dez vezes superior a de AFB₁. As aflatoxinas têm sido produzidas em pães integrais de trigo e centeio, em queijos *Tilsit* e em suco de maçã a 22°C. Essas micotoxinas tem sido observadas na camada superior de queijo *cheddar*, com três meses de maturação, mantido em temperatura ambiente. Em queijo *Brick*, a 12,8°C, foram produzidas *A. parasiticus* após uma semana, mas não *A. flavus*. A AFB₁ foi encontrada em três de 63 amostras comerciais de manteiga de amendoim, em níveis inferiores a 5ppb.

A produção de aflatoxina tem sido demonstrada em um grande número de produtos alimentícios, além dos previamente citados. Sob condições ótimas de crescimento, algumas toxinas podem ser detectadas em 24 horas ou dentro de 4 a 10 dias. Em amendoins, algumas observações devem ser consideradas, tais como o crescimento de fungos e a produção de aflatoxinas ocorrem, em grande parte, durante o armazenamento após a colheita; em um lote de amendoim contaminado, relativamente poucas



vações contêm toxina, de modo que o sucesso na detecção depende da coleta de uma amostra relativamente grande (aproximadamente 1 kg), por análise; a quantidade de toxina irá variar grandemente mesmo em uma única vação; e os dois fatores mais importantes que afetam a produção de aflatoxina são a umidade e a temperatura.

A FDA estabelece como permitidos os seguintes níveis de aflatoxinas para alimentos: 0,5 ppb em leite e 20ppb para alimentos, rações, nozes brasileiras, amendoins, produtos derivados de amendoim e pistaches. O Codex Alimentarius recomenda que sejam seguidos os seguintes níveis máximos de micotoxinas para produtos específicos: 15µg/kg de aflatoxinas em amendoins para processamento, 0,05µg/kg de aflatoxina M₁ em leite, 50µg/kg de patulina em suco de maçã e suco de maçã utilizado como ingrediente para outras bebidas, e 5µg/kg de ocratoxina em cereais e produtos de cereais.

Para a expressão de mutagenicidade, sistemas metabólicos de mamíferos são essenciais para o estudo das aflatoxinas, especialmente da AFB₁. Também é essencial sua ligação com ácidos nucleicos, especialmente DNA. Apesar do DNA nuclear ser normalmente afetado, tem sido demonstrado que a AFB₁ liga-se covalentemente ao DNA mitocondrial de células do fígado, preferencialmente ao DNA nuclear. Macromoléculas celulares que não sejam ácidos nucleicos são possíveis locais de ligação para aflatoxinas. Na molécula de aflatoxina,

a dupla ligação entre C₂-C₃ na estrutura de hidrofurfurano é o local responsável pela mutagenicidade. A redução da AFB₁ para a forma 2,3-dihidro (AFB₂) diminui a mutagenicidade em 200 a 500 vezes. Depois da ligação ao DNA, as aflatoxinas induzem mutações pontuais, que são consideradas lesões genéticas predominantes, apesar de serem observadas também mutações que alteram a leitura do DNA. A mutagênese da AFB₁ tem sido duas vezes maior na presença de butilhidroxianisol (BHA) e butilhidrotolueno (BHT) e menos influenciada na presença de galato de propila, quando esses compostos são empregados no teste de Ames (ensaio biológico para avaliar a mutagenicidade potencial dos compostos químicos. Um teste positivo indica que o produto químico pode agir como uma substância cancerígena. O procedimento é descrito em uma série de documentos desde o início dos anos de 1970, por Bruce Ames e sua equipe na Universidade da Califórnia, Berkeley). Porém, ainda se desconhece se o aumento da toxicidade ocorre em sistemas animais.

Em pesquisas, a maioria das espécies animais susceptíveis morreu três dias após a administração das toxinas e apresentou grandes danos ao fígado, o qual, após exame *post-mortem*, revelou a capacidade hepato carcinogênica da aflatoxina. A toxicidade foi maior em animais jovens e machos do que em animais mais velhos e fêmeas. Além disso, os efeitos tóxicos foram aumentados por dietas pobres em proteínas ou que prejudicavam o fígado.

Evidências circunstanciais sugerem que as aflatoxinas são carcinogênicas para humanos. Entre as consequências que se acredita serem devidas às aflatoxinas, pode-se citar a síndrome EFDV da Tailândia, a síndrome da Revê da Tailândia

e Nova Zelândia e hepatomas (carcinomas hepatocelulares) agudos em crianças na Uganda. Por outro lado, tem sido notado que nenhuma micotoxina está relacionada a um tipo de câncer específico em humanos na ausência de infecção crônica com vírus da hepatite B.

Embora algumas micotoxinas sejam extremamente tóxicas para animais jovens de muitas espécies, acredita-se que sua toxicidade para humanos seja exagerada.

A AFB₁ e a AFB₂ podem ser reduzidas no milho pelo bissulfito. Fígos secos contaminados com 250 ppb de AFB e submetidos a diversos tratamentos, 1% de bissulfito de sódio foi capaz de reduzir 28,2%, em 72 horas. Com 0,2% de H₂O₂ (adicionado 10 minutos antes do bissulfito de sódio) houve uma redução de 65,5%. Os aquecimentos de 45°C a 65°C por uma hora alcançaram uma redução de 68,4%, enquanto a radiação ultravioleta (UV) resultou em 45,7% de redução. Sementes de algodão contaminadas com aflatoxinas, tratadas com amônia e utilizadas como ração para vacas diminuíram os níveis de AFB₁ e AFM₁ no leite. Quando milho naturalmente contaminado com 1.600 ppm de aflatoxina foi tratado com 3% de NaOH a 100°C por 4 minutos, e posteriormente processado e frito, 99% da aflatoxina foi destruída.

CITRININA

A citrinina é produzida por *Penicillium citrinum*, *P. viridicatum* e outros fungos. Essa micotoxina tem sido detectada em arroz polido, pão mofado,



presunto curado, trigo, aveia, centeio e outros produtos similares. Sob luz ultravioleta de comprimento longo, a citrinina fluoresce amarelo-limão.

Essa micotoxina é conhecidamente carcinogênica. Em um estudo, a partir de presunto curado, foram isoladas sete linhagens de *P. viridicatum*. Quando o potencial toxigênico dessas linhagens foi avaliado, todas se apresentaram como produtoras de citrinina em caldo de batata glicosado e em presuntos curados, mantidos entre 20°C e 30°C, por 14 dias.

A citrinina foi identificada a partir de produtos alimentícios mofados e pode ser produzida em meio sintético, juntamente com outras micotoxinas.

Enquanto organismos produtores de citrinina são encontrados em sementes de cacau e café, essa micotoxina, assim como as outras, não é encontrada durante o desenvolvimento fúngico. A aparente razão é a inibição, pela cafeína, da produção de citrinina pelo *P. citrinum*. A inibição da produção de citrinina é parcialmente específica, uma vez que somente uma pequena redução no crescimento fúngico é observada.

OCRATOXINA

As ocratoxinas consistem em um grupo de, no mínimo, sete metabólitos secundários relacionados estruturalmente, dos quais a ocratoxina A (AO) é a mais conhecida e tóxica. A ocratoxina B (OB) é a forma descolorada da ocratoxina A e, assim como a ocratoxina C, pode não ocorrer naturalmente.

A ocratoxina A é produzida por um grande número de fungos encontrados durante a estocagem, incluindo *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. mellus*, além de outras espécies de *Aspergillus*. Entre os fungos do gênero *Penicillium* que produzem ocratoxinas A estão *P. viridicatum*, *P. cyclopium* e *P. variable*.

A ocratoxina A tem sua produção máxima em 30°C e em atividade de água (aw) de 0,95. Na produção de ocratoxina A por *A. ochraceus* a 30°C, a mínima atividade de água é de 0,85.

Essa toxina, hepatotóxica e nefrotóxica, têm sido encontrada em milho, feijão seco, sementes de cacau, grãos de soja, cevada, frutas cítricas, castanhas

do Brasil, tabaco mofado, presunto curado, amendoins, grãos de café e demais produtos similares.

Sob luz ultravioleta, a ocratoxina A fluoresce esverdeada, enquanto que a ocratoxina B emite fluorescência azul.

Duas linhagens de *A. ochraceus* isoladas de presunto curado produziram ocratoxina A e B em arroz, em pasta de amendoim sem gordura e em presuntos curados. De toda a toxina produzida, 2/3 penetraram 0,5 cm após 21 dias, permanecendo o outro 1/3 na região micelial. De seis linhagens de *P. viridicatum* isoladas de presunto curado, nenhuma produziu ocratoxina.

Em um estudo para avaliar a eficácia de quatro inibidores químicos diante do crescimento e produção de ocratoxina A por duas linhagens a pH 4,5, os resultados foram: sorbato de potássio > propionato de sódio > metilparabeno > bissulfato de sódio.

Como a maioria das micotoxinas, a ocratoxina A é termicamente estável. Em um estudo, a maior taxa de destruição alcançada pelo cozimento de sementes de fava foi de 20%; os pesquisadores concluíram que a ocratoxina A não pode ser destruída por procedimentos normais de cocção.

PATULINA

A patulina é produzida por um grande número de fungos do gênero *Penicillium*, incluindo *P. claviforme*, *P. expansum* e *P. patulum*. Pode ainda ser produzida por alguns fungos do gênero *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. terreus* e outros), por *Bissochlamys nivea* e *B. fulva*.

As propriedades biológicas da patulina se assemelham às do ácido penicílico. Alguns fungos da patulina podem produzi-la em temperaturas abaixo de 2°C. Essa micotoxina tem sido encontrada em pães mofados, linguiças, frutas (incluindo bananas, pêras, abacaxis, uvas e pêssegos), suco de maçã, sidras e outros produtos. Em suco de maçã, níveis de até 440 µm/L têm sido verificados e, em sidras, níveis de 45 ppm já foram demonstrados.

Juntamente com a citrinina e a ocratoxina A, a patulina tem sido identificada a partir de produtos alimentícios mofados.

A atividade de água mínima para o

crescimento de *P. expansum* e *P. patulum* tem sido relatada como de 0,83 e 0,81, respectivamente. Em caldo de batata glicosado incubada a 12°C, a produção de patulina por *P. patulum* e *P. roquefortii*, após 10 dias de incubação, atinge níveis de até 1.033 ppm. A produção de patulina é favorecida por temperaturas abaixo da ótima para o crescimento dos fungos.

Estudos com *P. expansum* encontraram produção de patulina na faixa de 5°C a -20°C, com pequenas quantidades sendo produzidas a 30°C. Atmosferas contendo CO₂ e N₂ reduzem a produção de patulina, quando comparadas às com ar. Para inibir a produção de patulina, o SO₂ mostrou-se mais efetivo do que o sorbato de potássio ou o benzoato de sódio.

Tanto a patulina quanto o ácido penicílico ligam-se a grupos -SH e -NH, formando compostos ligados covalentemente, tendo suas toxicidades reduzidas. A patulina causa aberrações cromossômicas em células animais e vegetais, além de ser carcinogênica.

ÁCIDO PENICÍLICO

O ácido penicílico tem propriedades biológicas similares às da patulina. É produzido por um grande número de fungos, incluindo os do gênero *Penicillium* (*P. puberulum*, por exemplo), assim como membros do grupo *A. ochraceus*. Um dos maiores produtores dessa toxina é o *P. cyclopium*. Essa micotoxina tem sido encontrada no milho, feijão e



outros produtos agrícolas, além de ter sido produzida experimentalmente em queijo suíço.

É uma micotoxina comprovadamente carcinogênica.

Em um estudo, de 346 culturas de *Penicillium* isoladas de salame, cerca de 10% produziram ácido penicílico em meio de cultura líquido, porém

cinco culturas que foram inoculadas em linguiça não produziram micotoxinas, mesmo após 70 dias. Em outro estudo, cerca de 183 fungos foram isolados de queijo suíço, sendo 87% do gênero *Penicillium*; destes, 93% cresceram a 5°C. Dos extratos de *Penicillium* avaliados, 35% foram tóxicos a embriões de galinha, e de 5,5% foram recuperados tanto ácido penicílico como patulina e aflatoxinas. O ácido penicílico foi produzido a 5°C, em seis semanas, por quatro de 33 linhagens fúngicas.

ESTERIGMATOCISTINA

Essas micotoxinas são estruturalmente e biologicamente relacionadas às aflatoxinas e, como estas, possuem atividade hepatocarcinogênica em animais. No mínimo oito derivados são conhecidos. Entre os organismos que produzem esterigmatocistina, estão *Aspergillus versicolor*, *A. nidulans*, e *A. rugulosus*. Sob luz ultravioleta, essa toxina fluoresce vermelho tijolo escuro.

Apesar de não ser frequentemente encontrada em produtos naturais, a esterigmatocistina tem sido observada em trigo, aveia, queijo holandês e grãos de café.

Embora esteja relacionada às aflatoxinas, a esterigmatocistina não é tão potente. Sua atuação é verificada pela inibição da síntese de DNA.

FUMONISINA

As fumonisinas são produzidas por fungos do gênero *Fusarium* em milho e em outros grãos. Algumas doenças humanas e animais estão associadas ao consumo de alimentos contaminados com altos níveis desses fungos.

As espécies produtoras de fumonisinas incluem *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. nygami*, *F. moniforme*, e *F. proliferatum*. As últimas espécies citadas são produtoras de grandes quantidades de fumonisinas. A *F. moniforme* (anteriormente *F. verticillioides*; *Gibberella fujikuroi*) foi a primeira espécie associada com essas micotoxinas e é a mais estudada das três. A prevalência de *F. moniforme* é significativamente maior em milho produzido em áreas onde ocorrem altas taxas de câncer de esôfago em humanos.

Existem, no mínimo, sete fumoni-

nas, sendo quatro do tipo B e, pelo menos, três do tipo A: FB₁, FB₂, FB₃, FB₄, FA₁, FA₂ e FA₃. As principais são a FB₁ e a FB₃, sendo as outras consideradas secundárias. Das três toxinas principais, a FB₁ (também designada macrofusina) é produzida em maiores quantidades por linhagens produtoras de fumonisinas. Por exemplo, entre nove linhagens de *F. moniforme*, a produção de FB₁ em milho autoclavado foi de 960 a 2.350 µg/g, enquanto a de FB₂ foi de 120 a 320 µg/g.

A fusarina C é produzida por *F. moniforme*, mas aparentemente não está envolvida em atividade hepatocarcinogênica. Essa micotoxina é mutagênica, mas somente após a ativação do fígado.

Com relação à temperatura e ao pH ótimos para crescimento, a máxima produção de FB₁ por uma linhagem de *F. moniforme* em cultura de milho foi obtida em 13 semanas, a 20°C e com uma produção de 17,9g/kg em peso seco. Além disso, a maior taxa de crescimento fúngico ocorreu em 25°C, sendo a fase estacionária alcançada no período de 4 a 6 semanas, na mesma temperatura. De modo geral, o tempo e a temperatura ótimos para produção de FB₁ foram de sete semanas a 25°C. Com relação ao crescimento de *F. moniforme*, estudos têm demonstrado bons resultados em temperaturas de 25°C a 30°C, em uma faixa de pH de 3 a 9,5.

Conservantes, como o ácido benzóico, BHA e carvacrol, têm sido inibidores ou retardadores do crescimento micelial de inúmeras linhagens de *Fusarium spp.*, sendo o ácido benzóico o mais efetivo, seguido pelo carvacrol e pelo BHA.

A estrutura química da FB₁ e da FB₂ difere somente no carbono 10, onde a FB₁ possui um grupo -OH em substituição ao -H presente na estrutura da FB₂. Essas micotoxinas diferem das demais descritas anteriormente de duas formas: não possuem grupamentos cíclicos ou anéis em suas estruturas e são solúveis em água. Por outro lado, são estáveis em calor, como muitas outras micotoxinas.

SAMBUTOXINA

A micotoxina conhecida como sambutoxina, foi primeiramente reportada em 1994. Está associada com batatas secas e apodrecidas e é principalmente produzida por linhagens de *Fusarium sambucinum* e *F. oxysporum*. De 13 espécies de *Fusarium* pesquisadas, cerca de 90% das linhagens pertencentes às duas espécies citadas produzem essa toxina.

Pesquisas realizadas com amostras de batatas apodrecidas provenientes da Coreia relataram que 9 de 21 amostras continham 15,8 a 78,1ng/g de sambutoxina, com uma média de 49,2ng/g. Utilizando substrato à base de trigo, níveis de 1,1 a 101,0µg/g de sambutoxina foram produzidas. A toxina foi encontrada em batatas provenientes de regiões do Irã que tinham alta incidência de câncer esofágico.

Segundo pesquisas realizadas com ratos, a sambutoxina causa hemorragia no estômago e intestino, sendo que os animais passam a rejeitar a ração e perdem peso.

ZEARALENONA

Existem cinco zearalenona de ocorrência natural, as quais são produzidas por *Fusarium spp.*, principalmente *F. graminearum* (anteriormente conhecido como *F. roseum* = *Gibberella zeae*) e *F. Tricinctum*. Associadas ao milho, esses organismos invadem a planta no estágio de floração, especialmente durante períodos chuvosos. Se os níveis de umidade permanecem suficientemente altos após a colheita, o fungo cresce e produz toxina. Outros grãos, como trigo, aveia, cevada e gergelim, podem ser infectados, além do milho.

A zearalenona fluoresce azul esverdeada sob luz ultravioleta de comprimento longo, e esverdeada sob luz



ultravioleta de comprimento curto.

Essas micotoxinas possuem propriedades estrogênicas e promovem cio em camundongos e hiperestrogenismo em suínos. Não são mutagênicas e produzem uma resposta positiva com *Bacillus subtilis*.

OUTRAS MICOTOXINAS

Existe aproximadamente uma quantidade aproximada de 400 diferentes micotoxinas já isoladas e caracterizadas quimicamente ao longo das últimas quatro décadas.

Entretanto, as pesquisas têm se concentrado naquelas substâncias que apresentam efeitos mais significativos sobre a saúde humana e animal. Ultimamente, muitas micotoxinas até então pouco estudadas passaram a chamar a atenção dos pesquisadores, em virtude de seu indiscutível potencial tóxico. As substâncias apresentadas a seguir incluem-se nesse grupo.

ÁCIDO FUSÁRIO, FUSARENONA X, FUSARINA C E MONILIFORMINA

Embora menos importantes que os principais tricotecenos, a zearalenona e as fumonisinas, micotoxinas fusariâneas, têm sido encontradas com elevada frequência em cereais, participando, principalmente, da cadeia alimentar de aves. O ácido fusário, por exemplo, interfere no consumo alimentar de aves, agindo na utilização do triptofano pelo cérebro, além de atuar sinergisticamente, aumentando a toxicidade de outras micotoxinas.

A Fusarenona X é um tricoteceno

com reconhecida citotoxicidade, provocando apoptose (morte celular programada ou a “autodestruição celular”) em células de rato, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

A Fusarina C, encontrada principalmente em grãos de milho, tem sido relacionada ao desenvolvimento de câncer de esôfago em humanos. Caracterizada como uma potente cardiotoxina, a moniliformina pode afetar frangos de corte, reduzindo o ganho de peso e aumentando o volume do coração.

RUGULOSINA

Produzida por espécies de *Penicillium*, especialmente por *Penicillium islandicum*, a rugulosina é um bisantraquinóide e é suspeita de causar danos renais e hepáticos em humanos. Em células de ratos e camundongos, essa substância induziu a formação de tumores em células hepáticas de camundongos machos.

LUTEOSQUIRINA

Também produzida por *Penicillium islandicum*, a luteosquirina é uma antraquinona e estaria associada à doença do “arroz amarelo”, no Japão. Sua capacidade nefrotóxica e hepatotóxica não está conclusivamente provada. Entretanto, o fungo produtor é comumente isolado a partir de alimentos.

ÁCIDOTENUAZÔNICO

Espécies do gênero *Alternaria* produzem cerca de 71 diferentes micotoxinas e fitotoxinas. Os metabólitos mais comuns são o alternariol, o alternariol metil éter, o altenueno e o ácido tenuazônico. Em dietas de aves contendo esses

metabólitos, apenas o ácido tenuazônico induziu a mortalidade de embriões de frangos e morte de pintos de 1 dia. Metabólitos de *Alternaria* spp. têm sido associados a uma síndrome conhecida como doença hemorrágica das aves.

FOMOPSINAS

Embora menos estudadas, as fomopsinas começam a despertar interesse dos pesquisadores, especialmente pela provável toxicidade a ovelhas. As fomopsinas A e B, por exemplo, obtidas a partir do fungo *Phomopsis leptostromiformis*, foram capazes de induzir lupinose (atrofia aguda do fígado) em ovinos e em ratos jovens. Evidências mais recentes indicam que além das fomopsinas A e B, esse fungo produz também outros metabólitos tóxicos. Outras espécies de *Phomopsis* são capazes de produzir também a micotoxina roridina A. A partir de uma cultura de *Phomopsis* sp., um endófito da casca de *Cavendishia pubescens*, pesquisadores obtiveram paspalitrem A e paspalitrem C, micotoxinas tremogênicas isoladas, até então, apenas de esclerócios de *Caviceps paspali*. Essas substâncias provocam desordens neurológicas em gado.

MICOTOXINAS E A REGULAMENTAÇÃO MUNDIAL

Legislações têm sido adotadas em muitos países com o intuito de proteger os consumidores contra os efeitos nocivos das micotoxinas em alimentos *in natura* e processados e, inclusive, em rações para animais de abate e de estimação. As legislações mais conhecidas são aquelas que regulamentam os níveis de aflatoxinas, não obstante legislações para outras micotoxinas estejam sendo também implementadas rapidamente. Existem diversos fatores que conduzem à elaboração dessas legislações. Por exemplo, existem os aspectos científicos, tais como a disponibilidade de informações toxicológicas, o conhecimento acerca da distribuição das micotoxinas nos alimentos, além da metodologia analítica. Também, devem ser considerados os aspectos políticos e econômicos, principalmente



com relação aos interesses comerciais e aos impactos na disponibilidade da oferta de alimentos.

Informações coligidas demonstram que cerca de 100 países já dispõem de legislação para regulamentar os limites de micotoxinas em alimentos, rações e *commodities*. Os países cobertos por essas legislações englobam aproximadamente 90% da população mundial. Esse levantamento confirma que o aumento na população, agora protegida pelas legislações de micotoxinas, ocorreu graças a um pequeno aumento observado na América Latina e Europa, e a um significativo aumento na cobertura populacional na África e Ásia/Oceania. Ademais, todos os países que possuem legislação para micotoxinas têm, pelo menos, limites regulamentares para a presença de aflatoxina B₁ ou para a soma B₁+B₂+G₁+G₂.

Entretanto, várias outras micotoxinas já estão também sob legislação. Dentre elas, destacam-se a aflatoxina M₁, os tricotecenos desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, as toxinas T₂ e HT₂, as fumonisinas B₁, B₂ e B₃, a ocratoxina A, a patulina, a esterigmatocistina, a zearalenona, os alcalóides ergóticos e, até mesmo, o ácido agárico e as fomopsinas. Tem-se observado que um maior número de micotoxinas encontra-se sob legislação, tendo-se elevado também o número de produtos e *commodities* analisados. Os limites de tolerância têm se mantido nos mesmos níveis ou têm mostrado uma tendência para decrescerem, enquanto que os métodos de amos-

tragem e de análise têm se tornado mais diversificados e muito mais detalhados. Uma tendência extremamente interessante é a harmonização das legislações nos países pertencentes aos diferentes blocos econômicos, tais como Austrália/Nova Zelândia, Comunidade Europeia e Mercosul.

Na maioria dos países africanos, onde não existe legislação em vigor, a população encontra-se exposta à contaminação com micotoxinas, principalmente com relação às culturas de subsistência, que são consumidas nas próprias áreas de produção ou nas suas vizinhanças. Os países africanos que possuem alguma legislação apenas as aflatoxinas são contempladas. Dentre os países daquele Continente, o Marrocos possui a legislação mais avançada. Com relação Ásia/Oceania cerca de 26 países possuem legislação para micotoxinas, representando 88% da população daquela região. A Nova Zelândia, entretanto, apresenta legislação própria, com algumas diferenças em relação à da Ásia e ao norte da Austrália. Atualmente, Austrália e Nova Zelândia estão harmonizando suas legislações que incluem limites para micotoxinas exóticas, tais como o ácido agárico e as fomopsinas. Nesses extensos continentes, as legislações da China e da República Islâmica do Irã são as mais completas e detalhadas.

No continente Europeu 39 países, representando 99% da população europeia, apresentam legislações para a regulação de micotoxinas em alimentos e rações. Comparada com outras regiões do mundo, a Europa dispõe da mais completa e detalhada legislação sobre micotoxinas em alimentos. Na comunidade europeia já foram harmonizadas as legislações para aflatoxinas em vários alimentos, como para aflatoxina M₁ em leite, ocratoxina A em cereais e frutos desidratados, para patulina em suco de maçã e produtos derivados de maçã, e para aflatoxina B₁ em várias rações. Ações preliminares já foram iniciadas com relação ao desoxinivalenol em cereais e em produtos derivados de cereais. Alguns países que ainda não

fazem parte da comunidade europeia possuem legislação ainda mais avançada que a própria comunidade.

Na América do Norte, os Estados Unidos e o Canadá possuem legislação para micotoxinas há muitos anos, e continuam aperfeiçoando os métodos de amostragem e análise. Nos dois países os limites para aflatoxinas são estabelecidos para a soma B₁+B₂+G₁+G₂. No Canadá, além dos limites impostos para as toxinas fusariâneas, existem também percentagens de tolerância para grãos danificados em espiguetas de trigo, tanto para o tipo mole quanto o tipo duro, além de limites para outros grãos. Existem, também, limites para a presença de esclerócios de *Claviceps purpurea* em várias culturas (é nos esclerócios onde se acumulam os alcalóides ergóticos). Nos Estados Unidos, existem detalhados limites de tolerância para a soma das fumonisinas B₁, B₂ e B₃ em uma ampla variedade de produtos de milho. Esse é único país no mundo onde ocorrem limites para a soma dessas três fumonisinas.

Na América Latina, 19 países dispõem de legislação para micotoxinas, representando quase 91% da população continental. A legislação para aflatoxinas encontra-se harmonizada no Mercosul, englobando a Argentina, o Brasil, o Paraguai e o Uruguai. O Uruguai possui a mais detalhada legislação da América Latina, com limites para os alcalóides ergóticos em rações, o que é inédito em qualquer legislação no mundo.

No continente sul americano, a legislação cobre, especialmente, as seguintes micotoxinas, em alimentos e em algumas rações: aflatoxina B₁, aflatoxinas B₁/G₁, aflatoxinas totais (B₁+B₂+G₁+G₂), fumonisina B₁, desoxinivalenol, ocratoxina A, patulina e a zearalenona.

CONCLUSÃO

A contaminação de alimentos e rações por micotoxinas representa um sério problema de saúde para humanos e animais, além de se constituir em considerável obstáculo à economia de países da África, Ásia e da América Latina, nos quais a balança comercial se baseia nas exportações de *commodities*.



Em virtude da presença de micotoxinas, milhões de dólares são perdidos anualmente, recursos que poderiam ser utilizados em projetos para a melhoria de vida dessas populações. Apesar dos esforços desenvolvidos desde a década de 1970, tanto por países em desenvolvimento quanto pelos países importadores, com intuito de reduzir a contaminação por micotoxinas, a situação continua ainda preocupante.

O reconhecimento dos problemas causados pelas micotoxinas nos alimentos e rações é, sem dúvida, o primeiro passo para a implementação de programas que permitam a adoção de medidas apropriadas para a prevenção e a redução do problema. Tais programas devem incluir não apenas as medidas de prevenção de ocorrência de micotoxinas em *commodities*, mas, também, o uso de métodos para sua remoção ou descontaminação. Devem, ademais, ter uma rotina de inspeção, legislação para controlar o fluxo de *commodities* contaminadas com micotoxinas no comércio nacional e internacional, bem como desenvolver atividades de informação, comunicação e, principalmente, de educação.

Na América Latina, países como a Argentina, o Brasil e o Uruguai, apesar da escassez de recursos financeiros e humanos, têm respondido muito bem aos problemas de contaminação de micotoxinas nas *commodities* regionais. Os cientistas envolvidos nas pesquisas com essas substâncias têm produzido resultados de nível semelhante aos produzidos em países da Comunidade Europeia e da América do Norte.

Um recente artigo de compilação dos trabalhos publicados na América Latina comprova essa afirmativa.

No Brasil, de acordo com a Resolução RDC no 274, da ANVISA, alimentos para o consumo humano estão sujeitos ao limite máximo para aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) de $20\mu\text{g}/\text{kg}$ (20ppb), enquanto para leite fluido é de $M_1=0,5\mu/\text{kg}$, e para leite em pó é de $M_1=5,0\mu\text{g}/\text{kg}$. Com relação a alimentos para consumo animal (matérias-primas e rações), por outro lado, a Portaria MA/SNAD/SFA no 183, do Ministério da Agricultura, estipula, para qualquer matéria-prima, para

alimentação direta ou como ingrediente para rações, o limite máximo para aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) de $50\mu\text{g}/\text{kg}$. Muito embora nossa legislação contemple apenas as aflatoxinas, cientistas brasileiros já estão, há bastante tempo, conduzindo pesquisas com outras importantes micotoxinas, como a citrinina, as fumonisinas, a ocratoxina A, a patulina, os tricotecenos e outras menos frequentes. Falta no Brasil, entretanto, um maior rigor no cumprimento das portarias. As fiscalizações são esporádicas e os laboratórios encarregados de realizar as análises encontram-se, em sua grande maioria, desprovidos de material e de pessoal especializado. Por outro lado, as discrepâncias observadas quanto aos limites e as micotoxinas sob legislação nos países da América Latina não são muito diferentes das discrepâncias ob-

servadas mesmo para continentes com países desenvolvidos. Atualmente, tem sido observada uma tendência na harmonização das legislações em todos os continentes, bem com uma tendência à redução dos limites máximos permitidos, especialmente para as aflatoxinas. A legislação sobre micotoxinas deveria estar sempre inserida nas agendas de discussão do agronegócio, nos diferentes países. É provável mesmo que em futuro não muito distante, e em virtude do crescente intercâmbio de commodities entre os países, ocorra uma harmonização da legislação para micotoxinas em nível global. Convém enfatizar que a amostragem de micotoxinas nas cadeias alimentares humana e animal exige o emprego de corretas técnicas estatísticas de amostragem, sem as quais os resultados finais obtidos serão inválidos.

