

Aspergillus flavus

AS MICOTOXINAS

Os fungos são elementos microbianos encontrados em todos os lugares, seja na água, no ar ou no solo. Existem milhares de espécies de fungos e, dentre estes milhares, algumas espécies atacam ou apenas sobrevivem em produtos agrícolas. Alguns destes fungos possuem a capacidade de produzir toxinas, chamadas de micotoxinas.

A história das micotoxinas começa 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, a qual havia sido produzida com amendoim importado da África e do Brasil. Esse amendoim estava contaminado com uma substância fluorescente produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*. Da expressão inglesa *A. flavus toxin* derivou a palavra aflatoxina. Hoje, é de conhecimento geral que não existe uma aflatoxina, mas no mínimo 17 compostos tóxicos, dentre os quais os mais importantes são as aflatoxinas B1, G1, B2 e G2, sendo que 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 subseqüentes encontraram outros fungos produtores de substâncias tóxicas diferentes. A Tabela 1 oferece uma visão geral das mais importantes micotoxinas.

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.

Uma vez que as micotoxinas costumam ser termoestáveis, a abordagem preventiva em relação a elas é de suma importância. Evitar a contaminação pelos fungos é freqüentemente impossível, visto que os principais bolores toxigênicos são bastante disseminados pelo ambiente. Portanto, restam estratégias ligadas à utilização de linhagens de plantas resistentes à colonização fúngica,

colheita apropriada, estocagem adequada, controle de insetos e roedores, controle de temperatura e umidade, tempo de estocagem dentro dos limites de vitalidade dos grãos, e, eventualmente, irradiação dos grãos.

Existem micotoxinas que são benéficas para o homem, como é o caso da penicilina, mas com efeitos tóxicos apenas para a bactéria que lhe é sensível. Nos cultivos agrícolas, existem aproximadamente 100 fungos encontrados no próprio campo de produção ou em produtos alimentares armazenados, e que são capazes de produzir micotoxinas, sendo que 20 tipos de fungos são causadores de doenças em animais que podem levar a problemas de saúde e, inclusive, à morte.

Por estarem presentes em quase todos os lugares, os fungos produtores de micotoxinas são capazes de germinar, crescer e produzir toxinas em uma grande variedade de produtos agrícolas. Para que isto aconteça devem haver condições favoráveis de umidade, temperatura e aeração.

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 e milho.	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B1	Hepatotóxica, nefrotóxica e 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 e vinho.	<i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i>	Ocratoxina	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica.
Frutas e sucos de frutas	<i>Penicillium expansum</i> e <i>Penicillium griseofulvum</i>	Patulina	Toxicidade vagamente estabelecida
Milho, cevada, aveia, trigo e centeio.	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Myrothecium sp.</i> , <i>Stachybotrys sp</i> e <i>Trichothecium sp</i>	Tricotecenos: T2, neosolaniol, fusanona x, nivalenol, deoxivalenol.	Hemorragias, vômitos e dermatites.
Cereais	<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona	Baixa toxicidade; síndrome de masculinização e feminização em suínos

Geralmente, as micotoxinas estão associadas a grãos armazenados e rações para alimentação animal, especialmente milho com alto teor de umidade, em silagem, semente de algodão, amendoim e soja. Algumas amêndoas, como a castanha do Brasil, também são bastante suscetíveis ao ataque de fungos devido às condições de produção na floresta, transporte e armazenamento em condições deficientes, com grande probabilidade de produção de micotoxina.

As micotoxinas mais conhecidas são as aflatoxinas, produzidas principalmente pelo fungo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. As aflatoxinas podem ser encontradas em milho, amendoim, caroço de algodão, bem como em outros grãos e algumas espécies de nozes. Também são conhecidas as fumonisinas e zearalenona em milho, ocratoxinas em café, temperos, soja e amendoim, entre outras.

Muitas das micotoxinas não têm seu efeito diminuído por processos de beneficiamento, como peletização em rações e acondicionamento em latas. Pouco pode ser feito se houver a constatação de contaminação de um lote de produtos agrícolas.

Alguns programas de descontaminação com produtos químicos são capazes de controlar o desenvolvimento de fungos e reduzir a concentração da micotoxina, mas deve-se levar em consideração a relação custo/benefício da atividade. Esses procedimentos de descontaminação não são eficientes em larga escala, tendo um custo muito elevado e com resultados ainda bastante discutíveis.

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 da 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, dispõe que alguns alimentos para o consumo humano, como o amendoim, milho em grão e leite, podem ter uma concentração máxima de 0,5ng/kg de aflatoxina, enquanto que a União Européia 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), 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 50ng/kg.

Por outro lado, as micotoxinas também são úteis ao homem e, pelo menos, três delas são substâncias de grande utilidade. A penicilina descoberta por Alexander Fleming (1928), produzida pelo *Penicillium chrysogenum* (ou *P. notatum*), foi uma grande descoberta da medicina no combate às infecções bacterianas. Apesar do surgimento de bactérias resistentes, até hoje este antibiótico - e numerosos derivados químicos desenvolvidos pela indústria farmacológica - são utilizados com sucesso no combate a inúmeras doenças. Outra utilidade das micotoxinas foi descoberta por Giuseppe Brotzu (1895-1976), professor de Higiene na Faculdade Médica e Reitor da Universidade de Cagliari (Itália), que analisando a água do mar próximo ao despejo de um esgoto, conseguiu isolar um fungo capaz de produzir uma substância que inibia o crescimento, em placas de ágar, de diversas bactérias. Este fungo foi denominado *Cephalosporium acremonium* e, em 1946 (após a publicação de seus resultados na revista *Lavori dell'istituto di igieni di Cagliari*), Brotzu enviou o

fungo ao Laboratório de Patologia da Universidade de Oxford. Ali, Edward Abraham, que havia estudado a penicilina, estudou e conseguiu produzir os antibióticos hoje chamados cefalosporinas, cujos derivados ainda são de grande importância no combate a bactérias resistentes às penicilinas. As cefalosporinas são antibióticos de estrutura química semelhante à das penicilinas, diferindo na conformação do anel β -lactâmico, tendo sido desenvolvidas por manipulação química quatro gerações sucessivas destes antibióticos - importantes no combate tanto a bactérias Gram-positivas como a Gram-negativas resistentes às Penicilinas. Entretanto, este fungo é também um importante causador de doenças no trigo. Por fim, a *ergotamina* e os alcalóides produzidos pelo esporão do centeio (*Claviceps purpurea*) são medicamentos utilizados no combate à enxaqueca. Entretanto, este medicamento provoca vasoespasmo importante e sua dosagem deve ser precisa, pois a superdosagem acarreta um quadro clínico de intoxicação conhecido como ergotismo.

OS TIPOS DE MICOTOXINAS

Um grande número de fungos produz substâncias conhecidas como micotoxinas. 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.

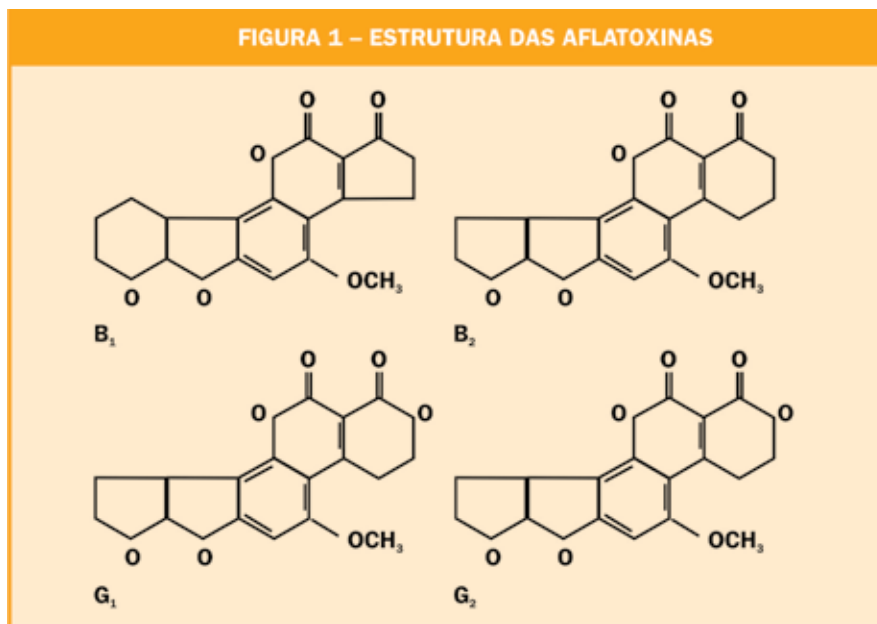
As micotoxinas são produzidas como metabólitos secundários. Os metabólitos primários dos fungos, como os de outros organismos, são aqueles essenciais ao crescimento. Já os secundários são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e não possuem significância aparente para o crescimento ou metabolismo do organismo produtor. Em geral, esses metabólitos parecem ser formados quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros, são acumuladas. A síntese de micotoxinas representa uma maneira de os fungos reduzirem a quantidade de precursores, os quais não são requeridos para o metabolismo.

A seguir são descritas as principais micotoxinas relacionadas com 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 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). Estudos sobre a natureza dessas substâncias tóxicas revelaram quatro componentes, os quais são apresentados na Figura 1.

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), essas micotoxinas fluorescem nas seguintes colorações: B1 e B2 – azul, G1 – verde, G2 – verde-azulada, M1 – azul-violeta, e M2 – violeta.

As micotoxinas são metabólitos secundários poliquetídicos, 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.

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

As aflatoxinas têm sido encontradas em uma ampla variedade de alimentos, incluindo leite, cerveja,

chocolate, uva passa, produtos à base de soja, entre outros. Em lingüiças fermentadas a 25°C, foi observada à produção de 160ppm e 426ppm de AFG, em um período de 10 e 18 dias, respectivamente, sendo a produção de AFG1 dez vezes superior à de B1. As aflatoxinas têm sido produzidas em pães integrais de trigo e centeio, em queijo *Tilsit* e em suco de maçã a 22°C. Essas micotoxinas têm 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 por *A. parasiticus* após uma semana, mas não por *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

vagens 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 vagem; e os dois fatores mais importantes que afetam a produção de aflatoxina são a umidade e a temperatura.

AFDA estabelece como permitidos os seguintes níveis de aflatoxinas para alimentos: 0,5ppb 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 de o DNA nuclear ser normalmente afetado, tem sido demonstrado que AFB1 liga-se covalentemente ao DNA mitocondrial de células do fígado, preferivelmente 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 hidrofurofurano 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 butilhidroxitolueno (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 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.

A susceptibilidade relativa de várias espécies animais à aflatoxina é apresentada na Tabela 2.

A maioria das espécies animais susceptíveis morre três dias após a administração das toxinas e apresenta

grandes danos ao fígado, o qual, após exame *post-mortem*, revela a capacidade hepatocarcinogênica da aflatoxina. A toxicidade é maior para animais jovens e machos do que para animais mais velhos e fêmeas. Além disso, os efeitos tóxicos são aumentados por dietas pobres em proteínas ou que prejudicam o fígado.

Evidências circunstanciais sugerem que as aflatoxinas são carcinogênicas para humanos. Entre as conseqüências 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 em 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

TABELA 2 – COMPARAÇÃO DA LETALIDADE DE DOSES SIMPLES DE AFLATOXINA B1

Animal	Idade (ou peso)	Sexo	Rota	Dose letal (mg/kg)
Pato	1 dia	M	O	0,37
	1 dia	M	O	0,56
Rato	1 dia	M – F	O	1,0
	21 dias	M	O	5,5
	21 dias	F	O	7,4
	100g	M	O	7,2
	100g	M	IP	6,0
Hamster	150g	F	O	17,9
	30 dias	M	O	10,2
	Adulto	M	IP	ca. 1,0
Coelho	Desmamado	M – F	IP	ca. 0,5
Cachorro	Adulto	M – F	IP	ca. 1,0
	Adulto	M – F	O	ca. 0,5
Truta	100g	M – F	O	ca. 0,5

Nota: O = oral; IP = intraperitoneal

animais jovens de muitas espécies, acredita-se que sua toxicidade para humanos seja exagerada.

A temperatura ótima para produção de micotoxinas está determinada entre 24°C e 28°C. 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.

AAFG, é produzida em temperaturas mais baixas de crescimento do que a AFB1. Alguns pesquisadores têm encontrado maior produção de AFB1 do que de 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.

CITRININA

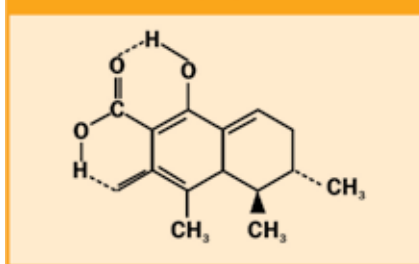
A citrinina é produzida por *Penicillium citrinum*, *P. viridicatum* e outros fungos. Essa micotoxina tem sido detectada em arroz polido, pão mofado, presunto curado, trigo, aveia, centeio e outros produtos similares. Sob luz ultravioleta de comprimento longo, a citrinina fluoresce amarelo-limão. Essa 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.

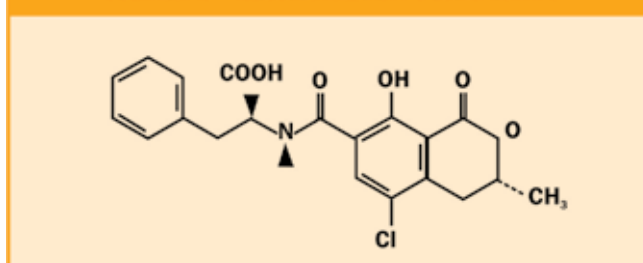
FIGURA 2 – ESTRUTURA DA CITRININA



OCRATOXINA

As ocratoxinas consistem em um grupo de, no mínimo, sete metabólitos secundários relacionados estruturalmente, dos quais a ocratoxina A (OA) é a mais conhecida e tóxica. A OB é a forma descolorada da OA e, como a OC, pode não ocorrer naturalmente. A OA 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 *Aspargillus*. Entre os fungos do gênero *Penicillium* que produzem OA, estão *P. viridicatum*,

FIGURA 3 – ESTRUTURA DA OCRATOXINA



P. cyclopium e *P. variable*.

A OA tem sua produção máxima em 30°C e aw de 0,95. Na produção de OA por *A. ochraceus* a 30°C, a mínima aw 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 OA fluoresce esverdeada, enquanto a OB emite fluorescência azul. Duas linhagens de *A. ochraceus* isoladas de presunto curado produziram OA e OB em arroz, em pasta de amendoim sem gordura e em presuntos curados. De toda toxina produzida, 2/3 penetraram 0,5cm 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 OA por duas linhagens a pH 4,5, os resultados foram: sorbato de potássio > propionato de sódio > metilparabeno > bissulfito de sódio.

Como a maioria das micotoxinas, a OA é termicamente estável. Em um estudo, a maior taxa de destruição alcançada pelo cozimento de sementes de fava foi de 20%, e os pesquisadores concluíram que a OA 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 *Aspargillus* (*A. clavatus*, *A. terreus* e outros), por *Bissochlamys nivea* e *B. fulva*.

As propriedades biológicas

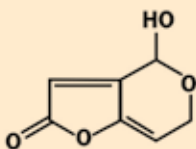
da patulina se assemelham às do ácido penicílico. Alguns fungos de patulina podem produzi-la em temperaturas abaixo de 2°C. Essa micotoxina tem sido encontrada em pães mofados, lingüiças, frutas (incluindo bananas, pêras, abacaxis, uvas e pêssegos), suco de maçã, sidras e outros produtos. Em suco de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

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

A aw 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 incubado a 12°C, a produção de patulina por *P. patulum* e *P. roquefortii*, após 10 dias de incubação, atinge níveis de até 1.033ppm. 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 de animais e vegetais, além de ser carcinogênica.

FIGURA 4 – ESTRUTURA DA PATULINA



ÁCIDO PENICÍLICO E ESTERIGMATOCISTINA



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 do *A. ochraceus*. Um dos maiores produtores dessa toxina é o *P. cyclopium*. Essa micotoxina tem sido encontrada em milho, feijão e outros produtos agrícolas, além de ter sido produzida experimentalmente em queijo suíço. É uma micotoxina comprovadamente carcinogênica.

Já a esterigmatocistina é estruturalmente e biologicamente relacionada às aflatoxinas e, como estas, possui atividade hepatocarcinogênica em animais. No mínimo, oito derivados são conhecidos. Entre os organismos que produzem esterigmatocistina, estão *Aspargillus 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.

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 destes alimentos contaminados com altos níveis desses fungos.

As espécies produtoras de fumonisinas incluem *F. anthophilum*,

F. dlamini, *F. napiforme*, *F. nygami*, *F. moniliforme* e *F. proliferatum*.

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

Existem, no mínimo, sete fumonisinas, 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 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. moniliforme*, a produção de FB1 em milho autoclavado foi de 960 a 2.350µg/g, enquanto a de FB2 foi de 120 a 320µg/g.

A fusarina C é produzida por *F. moniliforme*, 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. moniliforme* 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 a 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

FIGURA 6 – ESTRUTURA DA FUMONISINA

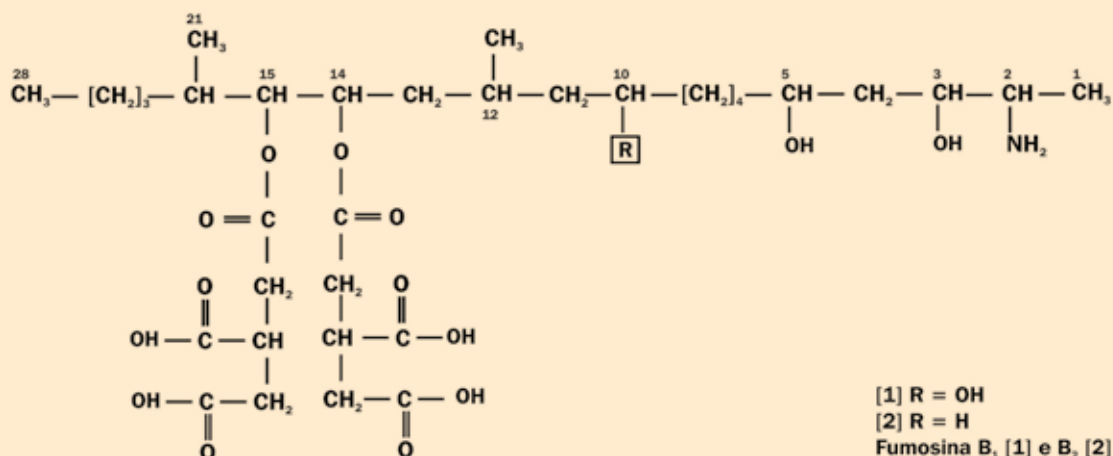
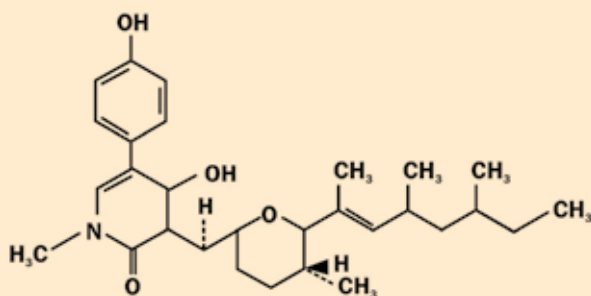


FIGURA 7 – ESTRUTURA DA SAMBUTOXINA



sete semanas a 25°C. Com relação ao crescimento de *F. moniliforme*, outros estudos têm demonstrado bons resultados em temperaturas de 25°C e 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 por 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

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 Coréia, 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 as pesquisas, a sambutoxina causa hemorragia no estômago e intestino de ratos, e os animais passam a rejeitar a ração e perdem peso.

muitas outras micotoxinas.

SAMBUTOXINA

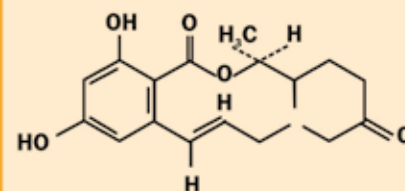
A micotoxina conhecida como sambutoxina foi primeiramente reportada em 1994. Está associada com batatas secas e apodrecidas e é principalmente

ZEARALENONA

Existem cinco zearalenonas de ocorrência natural, as quais são produzidas por *Fusarium spp.*, principalmente *F. graminearum* (anteriormente *F. roseum* = *Gibberella zeae*) e *F. Tricinctum*. Associados 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 UV de comprimento longo e esverdeada sob luz UV 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*.

FIGURA 8 – ESTRUTURA DA ZEARALENONA



DETECÇÃO, PREVENÇÃO E CONTROLE DE MICOTOXINAS

As micotoxinas ocorrem e exercem seus efeitos tóxicos em quantidades extremamente pequenas nos alimentos. Por isso, a sua identificação e avaliação quantitativa geralmente requer amostragem sofisticada, preparação de amostras, extração e técnicas de análise.

Em condições práticas de armazenamento o objetivo seria a monitoração da ocorrência de fungos. Se não for possível detectar fungos, então é possível que não haja nenhuma contaminação de micotoxinas. A presença de fungos indica a possibilidade de produção de micotoxinas e a necessidade de considerar o destino do lote de produtos atestados. Existem meios de descontaminar produtos atestados, mas são todos relativamente caros, e sua eficiência está ainda em discussão.

O Serviço Federal de Inspeção de Grãos dos Estados Unidos (*U.S. Federal Grain Inspection Service - FGIS*) avaliou oito testes rápidos de aflatoxina em milho, disponíveis comercialmente. Os conjuntos de equipamentos (kits) aprovados pelo FGIS incluem Teste Elisa rápido, cartucho de imunoafinidade, Teste Elisa de fase sólida, e procedimentos seletivos adsorventes de coluna mínima. Permanece ainda a necessidade de métodos de amostragem e análise eficientes e de custos reais, que possam ser utilizados em laboratórios de países em desenvolvimento.

Vários governos já estabeleceram limites regulamentares para micotoxina em alimentos e rações animais, para venda ou importação. Para a aflatoxina as diretrizes estabelecem uma faixa de 4 a 50 µg/kg. Os limites regulamentares para fumonisina estão sendo considerados.

Quanto a prevenção e controle das micotoxinas, deve-se levar em consideração que os fungos não podem crescer (ou micotoxinas

serem produzidas) em alimentos devidamente secos. Por isso, a secagem eficiente dos produtos e a sua conservação sem umidade é a medida eficaz contra o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas.

Para reduzir ou prevenir a produção da maioria das micotoxinas, o processo de secagem deve ser feito logo após a colheita e o mais rápido possível. A quantidade crítica de água para o armazenamento seguro corresponde a atividade da água (aw) de aproximadamente 0,7. A manutenção de alimentos abaixo de 0,7 aw é uma técnica eficaz usada mundialmente para controlar estragos provocados por fungos e produção de micotoxinas em alimentos.

Problemas como a manutenção de aw adequadamente baixa ocorrem freqüentemente nos trópicos, onde a elevada umidade ambiental dificulta o controle da umidade do produto. Onde o grão é armazenado em sacos, métodos que empregam cuidadoso sistema de secagem e, subsequente armazenamento em folhas de plástico à prova de umidade poderão superar este problema.

É possível controlar o crescimento de fungos em produtos armazenados através do controle ambiental ou uso de preservativos ou inibidores naturais.

O grão estragado tem mais tendência para invasão de fungos e, conseqüentemente, para contaminação de micotoxinas. Por isso, é importante evitar estrago antes e durante o processo de secagem, bem como no armazenamento. A secagem do milho na espiga, antes de descascar, é uma prática muito boa.

Os insetos são as principais causas de estragos: pragas de insetos de campo e algumas espécies de armazenamento estragam o grão e estimula, em ambiente úmido, o crescimento de fungos no grão em amadurecimento. No armazenamento, muitas espécies de insetos atacam o grão, e a umidade que pode acumular oferece um meio ideal para fungos. É essencial que o grão armazenado

seja conservado livre de insetos, do contrário, são inevitáveis os problemas de umidade e mofo. Este se forma se faltar ao grão ventilação adequada e, particularmente, se forem usados contentores de metal.

Nas regiões tropicais, pode ser difícil manter secos os produtos durante o armazenamento, mas nunca é demais enfatizar a importância do armazenamento seco. Em pequena escala, embalagens de polietileno são eficazes; em larga escala, o armazenamento seguro requer estruturas bem projetadas, com pisos e paredes impermeáveis contra umidade. A manutenção da umidade do armazém abaixo de 70% é crucial.

Nas regiões tropicais, a umidade do ar livre geralmente decresce, abaixo de 70%, em dias ensolarados. A ventilação durante um período de tempo devidamente controlado, preferivelmente com ventilador, ajudará muito a manter baixa a umidade. O ideal é que as áreas de armazenamento de grande escala sejam equipadas com instrumentos de controle de umidade.

O armazenamento vedado em ambientes modificados para controle de insetos é também muito efetivo para o controle do crescimento de fungos, desde que o grão seja devidamente seco antes do armazenamento e desde que sejam minimizadas as flutuações da temperatura diurna.

Se for necessário armazenar os produtos antes da adequada secagem, isso deve ser feito por um período curto de, no máximo, três dias. O uso de armazém vedado ou ambientes modificados prolongará este período de segurança, mas esses procedimentos são relativamente caros e em condições estancas.

Torna-se necessário um sistema comprovado de gestão de estoque, que leve em consideração as micotoxinas como parte integral desse sistema. Já existe uma variedade de sistemas de apoio para a tomada de decisões, que abrangem vários níveis de sofisticação e escala.