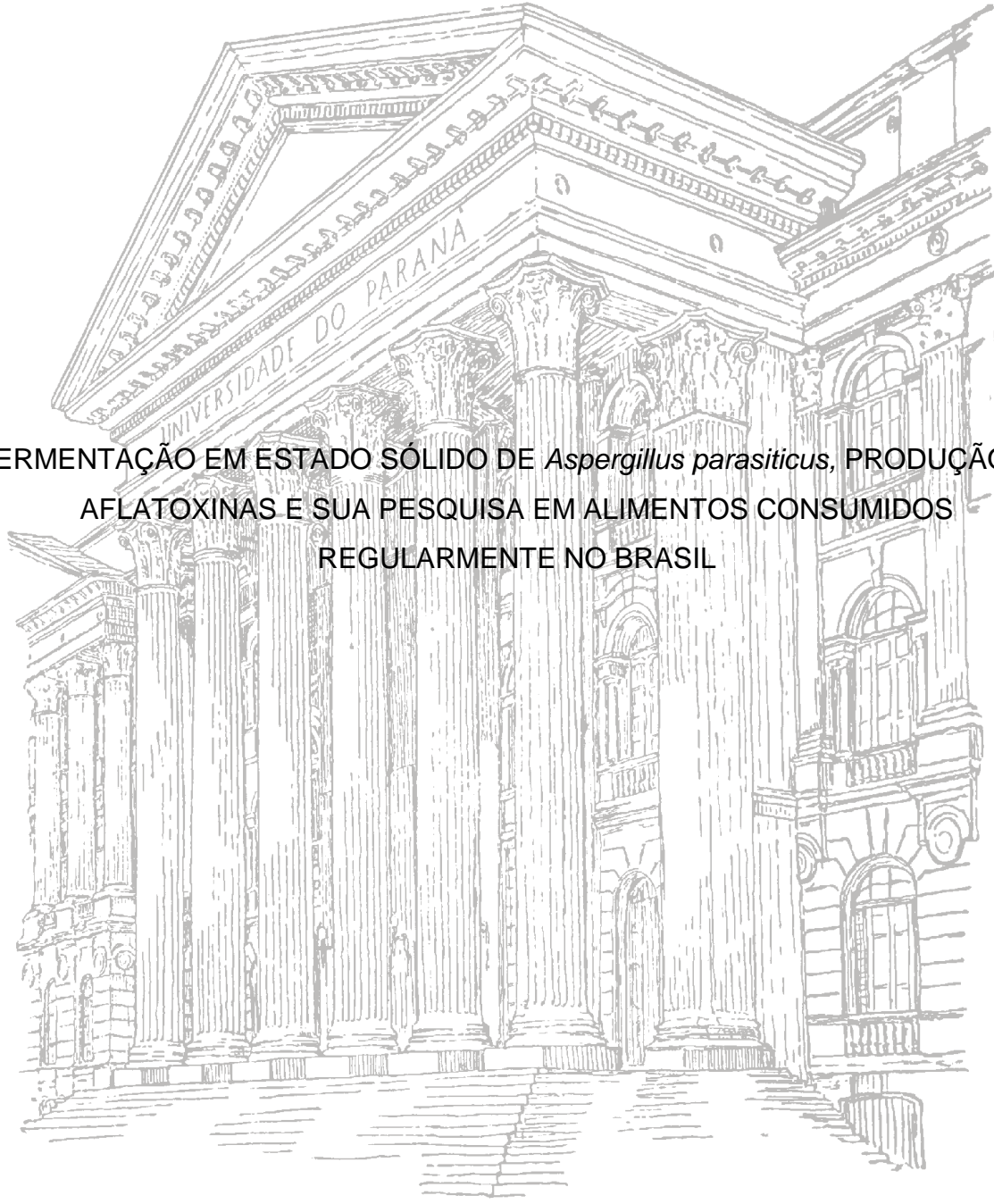


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÉSSICA MARI DOMINGUES



FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE *Aspergillus parasiticus*, PRODUÇÃO DE
AFLATOXINAS E SUA PESQUISA EM ALIMENTOS CONSUMIDOS
REGULARMENTE NO BRASIL

CURITIBA

2015

JÉSSICA MARI DOMINGUES

FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE *Aspergillus parasiticus*, PRODUÇÃO DE
AFLATOXINAS E SUA PESQUISA EM ALIMENTOS CONSUMIDOS
REGULARMENTE NO BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eliane Carneiro Gomes

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner

Prof^a. Dr^a Debora Brand

CURITIBA

2015

Domingues, Jéssica Mari

Fermentação em estado sólido de *Aspergillus parasiticus*, produção de aflatoxinas e sua pesquisa em alimentos consumidos regularmente no Brasil / Jéssica Mari Domingues – Curitiba, 2015.

73 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Eliane Carneiro Gomes

Coorientador: Professor Dr. Ricardo Wagner

Coorientadora: Professora Dra. Debora Brand

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Aflatoxina. 2. *Aspergillus parasiticus*. 3. Fermentação em estado sólido. I. Gomes, Eliane Carneiro. II. Wagner, Ricardo. III. Brand, Debora. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.


CDD 660.28449

TERMO DE APROVAÇÃO

JÉSSICA MARI DOMINGUES


Título: "Cultivo de *Aspergillus parasiticus* em substrato sólido, produção de aflatoxinas e sua pesquisa em alimentos consumidos regularmente no Brasil"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Profa. Dra. Eliane Carneiro Gomes
Orientadora


Prof. Dr. Ricardo Wagner
Co-orientador


Profa. Dra. Sandra Mara Woranovicz Barreira
Universidade Federal do Paraná


Profa. Dra. Marcia Regina Beux
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 11 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais, Rita de Cássia e Altemar, minha eterna
fortaleza.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo a Deus “O Senhor é meu pastor e nada me faltará” Salmo 23.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Wagner, quem me incentivou a iniciar essa etapa e que já esteve presente em outra etapa importante da minha vida. Além de um professor é um amigo. Obrigada pelo apoio e confiança.

Agradeço a Prof^a. Debora Brand por aceitar me acompanhar nessa jornada e por ser compreensiva com todas as dificuldades que apareceram durante esse caminho.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Tania por me receber muito bem no laboratório e por me ajudar sempre que possível.

Agradeço a Maria da Graça (Gracinha) pela disponibilidade e pela ajudada oferecida.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

Agradeço ao André Lucas Simão não só pela ajuda com os experimentos, mas também pelo incentivo, apoio e paciência.

Agradeço aos meus colegas de mestrado, em especial a Isabel Mignoni pela parceira e companheirismo durante este período.

Agradeço as minhas colegas de laboratório por toda ajuda prestada durante os experimentos.

Agradeço ao meu afilhado Eduardo, pois mesmo quando parecia que nada mais daria certo, foi o seu sorriso que me encorajou a seguir em frente.

Agradeço as minhas amigas Marcella, Bruna e Isabela por sempre estarem presentes em momentos importantes.

Agradeço a minha madrinha Lea por me escutar reclamando e falando dos problemas que enfrentei durante o mestrado.

Agradeço a Bolota por me fazer sorrir e brincar mesmo quando estava muito cansada.

Agradeço ao meu irmão Bruno porque mesmo ele escondendo, eu sei o quanto torce por mim.

Agradeço aos meus pais. Mãe, obrigada por sempre me apoiar e me entender, por sempre acreditar em mim mesmo quando eu não acreditei e por sempre tentar me mostrar que por mais difícil que seja, se eu quiser eu vou alcançar meus objetivos. Pai, obrigada por sempre me mostrar que pra tudo existe uma solução, obrigada por sempre exigir o melhor de mim, se estou conquistando mais uma vitória, com certeza sua participação é enorme.

E a todos aqueles que eventualmente não foram citados, mas que, com certeza, participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“A educação é a arma mais poderosa que temos para mudar o mundo”.

Nelson Mandela

RESUMO

Aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos principalmente por fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. A contaminação de alimentos por esta micotoxina é uma preocupação mundial devido às duas propriedades toxicológicas. Existem mais de 20 aflatoxinas conhecidas, porém as 4 principais são AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, sendo a AFB1 a de maior importância devido a sua atividade carcinogênica. Em vista da ampla variedade de alimentos em que são encontradas as aflatoxinas, o presente trabalho teve como objetivo a pesquisa de alimentos contaminados e a fermentação em estado sólido de *Aspergillus parasiticus*. Para a pesquisa em alimentos analisou-se 27 amostras (arroz, feijão, farinha de trigo, farinha de fubá, milho e amendoim) por CLAE e foi encontrada contaminação em 22% dos alimentos, sendo 4 amostras de arroz, 1 amostra de feijão e 1 amostra de amendoim. Como substratos para a fermentação em estado sólido optou-se por arroz branco, arroz cateto, amendoim, milho e farinha de trigo integral. Após a avaliação da produção de AF nestes meios através de CLAE e CCD verificou-se que o meio que oferecia melhores condições de trabalho e de produção de AF era o arroz cateto. Ao utilizar o arroz cateto como substrato variou-se o pH do meio entre 3,5 e 7,5 e umidade entre 42% e 62%. Posteriormente a análise destes meios por CCD e CLAE percebeu-se que os meios com valores maiores de umidade (62%) apresentaram maior produção de AF, enquanto a variação de pH não apresentou influência nessa concentração de AF.

Palavras-chave: Aflatoxina; *Aspergillus parasiticus*; Fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

Aflatoxins are secondary metabolites produced mainly by fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Contamination of food by this mycotoxin is a global concern due to their toxicological properties. There are over 20 known aflatoxins, but the top four are AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2, the first one being the most important because of its proven carcinogenic activity. Considering the wide variety of foods where aflatoxins are found, this study aimed the research of contaminated food and the evaluation of solid state fermentation of *Aspergillus parasiticus*. While the research of contaminated food, 27 samples (rice, bean, wheat flour, cornmeal flour, corn and peanut) were analyzed by high performance liquid chromatography and 22% of samples were contaminated. Some contamination was found in 4 rice samples, 1 bean sample and peanut sample. Analyzing the fungal growth in solid state fermentation, as substrates were used white rice, catetus rice, peanut, corn and wheat flour. After evaluating the aflatoxin production in these substrates by high performance liquid chromatography and thin layer chromatography, it was observed that the medium with better conditions to work and to produce AF was catetus rice. Using catetus rice as substrate was evaluated different values of pH between 3.5 and 7.5 and humidity between 42% and 52%. These medium were assessed by HPLC and TLC and it was realized the largest production of AF in high humidity levels (62%) and the pH didn't show any influence.

Keywords: Aflatoxin; *Aspergillus parasiticus*; Solid state fermentation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURA QUÍMICA DAS AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 e AFM2 (HUSSEIN, BRASEL, 2001).....	20
FIGURA 2 -	METABOLISMO DA AFLATOXINA B1 (McLEAN e DUTTON, 1995)	23
FIGURA 3 -	LIMITE MUNDIAL PARA AFLATOXINAS TOTAIS EM ALIMENTOS (FAO, 2003)	31
FIGURA 4 -	LIMITE MUNDIAL PARA AFLATOXINA B1 EM ALIMENTOS (FAO, 2003)	31
FIGURA 5 -	LIMITE MUNDIAL PARA AFLATOXINA M1 EM LEITE (FAO, 2003) .	32
FIGURA 6 -	ÁREAS E POPULAÇÕES DE RISCO DE EXPOSIÇÃO CRÔNICA À AFLATOXINA (FONTE: WILLIAMS <i>et al.</i> , 2004)	37
FIGURA 7 -	CRESCIMENTO DE <i>Aspergillus parasiticus</i> ENTRE LAMINA E LAMINULA. EM (A) AUMENTO DE 40x E EM (B) AUMENTO DE 100x	48
FIGURA 8 -	CULTIVO DE <i>A. parasiticus</i> EM: (A) MILHO, (B) FARINHA DE TRIGO INTEGRAL, (C) ARROZ BRANCO, (D) ARROZ CATETO, (E) AMENDOIM	50
FIGURA 9 -	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DOS MEIOS SÓLIDOS (AM – AMENDOIM; MI – MILHO; AC – ARROZ CATETO; AB – ARROZ BRANCO E FT – FARINHA DE TRIGO INTEGRAL)	51
FIGURA 10 -	CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO CULTIVO DE <i>A. parasiticus</i> EM MEIO SÓLIDO AMENDOIM.....	52
FIGURA 11 -	CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO CULTIVO DE <i>A. parasiticus</i> EM MEIO SÓLIDO MILHO	52
FIGURA 12 -	CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO CULTIVO DE <i>A. parasiticus</i> EM MEIO SÓLIDO ARROZ BRANCO	53
FIGURA 13 -	CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO CULTIVO DE <i>A. parasiticus</i> EM MEIO SÓLIDO ARROZ CATETO	53
FIGURA 14 -	CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO CULTIVO DE <i>A. parasiticus</i> EM MEIO SÓLIDO FARINHA DE TRIGO INTEGRAL	54
FIGURA 15 -	CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS A INJEÇÃO DO PADRÃO CONTENDO AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2	54

FIGURA 16 -	CURVA PADRÃO DE AFB2 POR CLAE	55
FIGURA 17 -	CCD DOS EXTRATOS OBTIDOS DOS MEIOS COM DIFERENTES VALORES DE pH E UMIDADE DE EM: 1 (pH 3,5 E UMIDADE 42%), 2 (pH 3,5 E UMIDADE 52%), 3 (pH 3,5 E UMIDADE 62%), 4 (pH 5,5 E UMIDADE 42%), 5 (pH 5,5 E UMIDADE 52%), 6 (pH 5,5 E UMIDADE 62%), 7 (pH 7,5 E UMIDADE 42%), 8 (pH 7,5 E UMIDADE 52%) E 9 (pH 7,5 E UMIDADE 62%).....	56
FIGURA 18 -	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO pH E UMIDADE NO MEIO DE EM: 1 (pH 3,5 E UMIDADE 42%), 2 (pH 3,5 E UMIDADE 52%), 3 (pH 3,5 E UMIDADE 62%), 4 (pH 5,5 E UMIDADE 42%), 5 (pH 5,5 E UMIDADE 52%), 6 (pH 5,5 E UMIDADE 62%), 7 (pH 7,5 E UMIDADE 42%), 8 (pH 7,5 E UMIDADE 52%) E 9 (pH 7,5 E UMIDADE 62%).....	58
FIGURA 19 -	CURVA DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINA B2	59
FIGURA 20 -	CROMATOGRAMA AFB2 PURIFICADA E PADRÃO	60
FIGURA 21 -	CROMATOGRAMA DAS AFLATOXINAS B1, B2, G1 E G2 E DERIVADOS B2a E G2a (OS VALORES DE 10, 20, 30 e 40 REFEREM-SE AO VOLUME DE TFA QUE FOI ADICIONADO A 100uL DO EXTRATO DAS AFLATOXINAS	61
FIGURA 22	CROMATOGRAMA PADRÃO E DERIVADOS AFB2a E AFG2a	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MEIOS SÓLIDOS SELECIONADOS PARA A INOCULAÇÃO DOS ESPOROS.....	42
TABELA 2 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA CLAE	44
TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES TESTADAS DAS AFLATOXINAS PARA A CURVA PADRÃO	44
TABELA 4 - VARIAÇÃO DE UMIDADE E pH DO MEIO DE CULTIVO SÓLIDO ..	45
TABELA 5 - ABSORÇÃO DE ÁGUA DOS SUBSTRATOS	49
TABELA 6 - VALORES DE pH DOS CULTIVOS PARA AS DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH E UMIDADE	56
TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO DE AFB ₂ DURANTE PERÍODO DE CRESCIMENTO DE 10 DIAS	59
TABELA 8 - VALORES DE R _f DAS AFLATOXINAS E DERIVADOS COMPARADOS AO TRABALHO DE MACHINSKI JUNIOR (2008).....	62
TABELA 9 - ANÁLISE DOS ALIMENTOS PARA A PRESENÇA DE AFLATOXINAS.....	62

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - MICOTOXINAS PRODUZIDAS POR ESPÉCIES DE <i>Aspergillus</i> (SAMSON, HONG E FRISVAD, 2006).....	21
QUADRO 2 - FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO E NOS NÍVEIS DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS (BRYDEN, 2012)	29
QUADRO 3 - LIMITE MÁXIMO DE TOLERÂNCIA DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS (FONTE: BRASIL, 2011)	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	– Porcentagem
AF	– aflatoxina
AFB1	– aflatoxina B1
AFB2	– aflatoxina B2
AFB2a	– aflatoxina B2a
AFG1	– aflatoxina G1
AFG2	– aflatoxina G2
AFG2a	– aflatoxina G2a
AFM1	– aflatoxina M1
AFM2	– aflatoxina M2
CCD	– cromatografia em camada delgada
CLAE	– cromatografia líquida de alta eficiência
cm	– centímetros
CYP	– citocromo
DNA	– ácido desoxirribonucleico
G	– gramas
Kg	– quilogramas
ml	– mililitros
°C	– graus Celsius
PDA	– Ágar dextrose batata
pH	– potencial hidrogeniônico
Rf	– fator de referência
RNA	– ácido ribonucléico
rpm	– rotações por minuto
TFA	– ácido trifluoracético
µg/mL	– micrograma por mililitro
µL	– microlitro
v/v	– volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVO GERAL.....	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 MICOTOXINAS	17
2.2 AFLATOXINAS.....	18
2.3 FUNGOS PRODUTORES DE AFLATOXINAS.....	20
2.4 TOXICOCINÉTICA	21
2.5 TOXICODINÂMICA.....	23
2.6 ALIMENTOS CONTAMINADOS POR AFLATOXINAS.....	25
2.6.1 <i>Amendoim</i>	25
2.6.2 <i>Milho</i>	26
2.6.3 <i>Arroz</i>	27
2.6.4 <i>Trigo</i>	27
2.6.5 <i>Feijão</i>	28
2.7 FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE AFLATOXINA	28
2.8 LEGISLAÇÃO	30
2.9 RELATOS DE CASOS DE INTOXICAÇÕES AGUDAS E CRÔNICAS POR AFLATOXINAS.....	34
2.10 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 AQUISIÇÃO DA CEPA DE FUNGO	40
3.2 ALIMENTOS PESQUISADOS	40
3.2.1 <i>Alimentos pesquisados na fermentação em estado sólido</i>	40
3.2.2 <i>Alimentos pesquisados para a presença de aflatoxinas</i>	40
3.3 CULTIVO DA CEPA NRRL 2999 – <i>ASPERGILLUS PARASITICUS</i>	40
3.3.1 <i>Ativação do fungo e suspensão de esporos</i>	41
3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA	41
3.5 SELEÇÃO DO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DA AFLATOXINAS EM MEIO SÓLIDO	42
3.5.1 <i>Teste de absorção de água</i>	42
3.5.2 <i>Inoculação da suspensão de esporos no meio sólido</i>	42
3.6 EXTRAÇÃO DAS MICOTOXINAS.....	43
3.6.1 <i>Purificação</i>	43
3.7 ANÁLISE DAS AFLATOXINAS EXTRAÍDAS DO MEIO DE CULTURA	43

3.7.1 Curva padrão CLAE.....	44
3.8 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO PH E DA UMIDADE DO MEIO NA PRODUÇÃO DE AFLATOXINA.....	45
3.9 CURVA DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS.....	45
3.10 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE AFLATOXINA B2	46
3.11 DERIVATIZAÇÃO DAS AFLATOXINAS COM ÁCIDO TRIFLUORACÉTICO (TFA).....	46
3.12 ANÁLISE DE AFLATOXINA PRESENTE EM ALIMENTOS	46
3.12.1 Extração da aflatoxina.....	47
3.12.2 Identificação e quantificação da aflatoxina por CLAE.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 MORFOLOGIA DO <i>A. PARASITICUS</i>	48
4.2 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS	48
4.2.1 Teste de absorção.....	48
4.2.2 Produção de aflatoxinas em diferentes substratos.....	49
4.3 CURVA PADRÃO DE AFB2 POR CLAE.....	54
4.4 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO PH E UMIDADE DO MEIO.....	55
4.4.1 Análise da influência do pH e umidade do meio por CCD.....	55
4.4.2 Análise da influência do pH e umidade do meio por CLAE.....	57
4.5 CURVA DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINA B2	58
4.6 PURIFICAÇÃO AFB2	60
4.7 DERIVATIZAÇÃO DAS AFLATOXINAS.....	60
4.8 ANÁLISE DAS AFLATOXINAS EM ALIMENTOS	62
5 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

INTRODUÇÃO

É possível encontrar leveduras e fungos em vários ambientes distintos, isso ocorre devido a tolerância que eles apresentam a variações ambientais como alterações de pH, temperatura, umidade e outros, além de possuírem a capacidade de utilizar diversos substratos para o seu crescimento (GARCIA *et al.*, 2009).

Os alimentos apresentam nutrientes essenciais para o crescimento de fungos, como os carboidratos, uma ótima fonte de carbono (GARCIA *et al.*, 2009). Em 2001, foi constatado que aproximadamente 25% de culturas do mundo são contaminadas por micotoxinas. Esta contaminação prejudica a produtividade pecuária e contribui para perda de colheitas, proporcionando perdas econômicas para as indústrias alimentícias, além dos custos apresentados por programas de controle para a análise de micotoxinas (BRULA *et al.*, 1999; CHELI *et al.*, 2013).

Estas substâncias tóxicas, as micotoxinas, podem ocorrer em vários alimentos destinados ao consumo humano e animal, incluindo cereais, grãos de trigo e milho e seus derivados, assim como em alimentos fermentados como a silagem de milho. A investigação de micotoxinas em alimentos destinados a animais tem se concentrado em comodites como grãos e cereais. A ocorrência de fungos em alimentos não confirma a presença de micotoxinas, pois a produção da mesma depende de vários fatores como pH, temperatura, umidade, substrato além de ser necessário que o fungo seja toxigênico (ROIGÉ *et al.*, 2009).

O termo micotoxina tem origem grega onde a palavra *mykes* significa fungo e no latim *toxicum* refere-se à toxina ou fungo tóxico (BULLERMAN, 1999). Em condições laboratoriais, cerca de 300 micotoxinas foram produzidas a partir de culturas puras de fungos e caracterizadas quimicamente. Apenas 20 destas micotoxinas são conhecidas por apresentarem níveis significativos e frequentes de ocorrência em alimentos (STEYN, 1995).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos e provocam efeitos adversos à saúde quando ingeridos por humanos e animais (FAO, 2001). Estes efeitos indesejáveis são conhecidos como micotoxicoses e entre eles estão: toxicidade hepática e renal, efeitos estrogênicos e efeitos sobre o

sistema nervoso (ELSANHOTY *et al.*, 2013). Os problemas naturais de micotoxinas são baseados em micotoxicoses documentadas em humanos. Entre estes problemas estão: o ergotismo na Europa, aleucia alimentar tóxica (ATA) na Rússia, aflatoxicoses agudas no sul e leste da Ásia e câncer primário de fígado humano (PLC) na África e sul e leste da Ásia (STEYN, 1995).

As micotoxinas são geralmente produzidas pelos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Claviceps*. O gênero *Alternaria* produz ácido tenuazônico, alternariol e alternariol metil éter. *Aspergillus* é produtor de aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), estirigmatocistina e ácido ciclopiazônico; *Fusarium* sintetiza deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, diacetoxiscirpenol, fumonisinas e moniliformina; *Penicillium* é conhecido por produzir patulina (PTA), OTA, citrinina, penitrem A (PA) e ácido ciclopiazônico; e o *Claviceps* produz os alcalóides do ergot (STEYN, 1995). A biossíntese de micotoxinas pode ocorrer em várias etapas da produção dos alimentos, como no campo, durante e pós colheita, armazenamento e outras. As cepas toxigênicas de *Aspergillus* e *Penicillium* são fungos considerados de armazenamento (ROIGÉ *et al.*, 2009).

Aspergillus flavus e *Aspergillus parasiticus* são evidentemente as duas espécies com maior potencial de produção aflatoxigênica entre os *Aspergillus* seção flavi (SAMSON *et al.*, 2009). Estes fungos possuem a capacidade de produzir aflatoxinas (AFs) dos grupos B (AFB1 e AFB2) e G (AFG1 e AFG2), existe também a AFM1, produto de biotransformação do grupo B na alimentação de bovinos e leite (TABATA, 2011). Conforme a *International Agency Research of Cancer* (IARC), AFB1 é classificada como Grupo 1, sendo cancerígena aos seres humanos e AFM1 como Grupo 2B, apresentando possível risco de câncer em humanos (RUBIO *et al.*, 2009).

Em vista do potencial carcinogênico das aflatoxinas, a presença das mesmas em alimentos é considerada um problema de saúde pública, apresentando riscos a saúde humana e animal. Desta forma a análise de cultivo de fungos produtores destas micotoxinas em substratos sólidos é uma importante ferramenta para o desenvolvimento de estratégias que diminuam significativamente a contaminação de alimentos.

OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo a pesquisa de aflatoxinas em alimentos normalmente consumidos no Brasil e o estudo da fermentação em estado sólido do fungo *Aspergillus parasiticus*, com ênfase na produção de aflatoxinas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar morfológicamente a cepa NRRL 2999 em cultivo entre lâmina e lamínula;
- selecionar o melhor substrato sólido para o cultivo do fungo *Aspergillus parasiticus* e produção das 4 principais AF;
- produzir e extrair as AF dos meios de cultura;
- selecionar as melhores condições de pH e umidade para a produção de AFB₂;
- produzir uma curva de produção de AFB₂;
- fazer a pesquisa de AF em alimentos, quantificando estas micotoxinas e relacionando com a legislação vigente no Brasil.

REVISÃO DE LITERATURA

1.3 Micotoxinas

Toxinas são substâncias sintetizadas por plantas, animais ou micro-organismos como as micotoxinas que são metabólitos produzidos por fungos. Estas substâncias apresentam riscos a saúde humana e animal (TURNER *et al.*, 2009).

O termo micotoxina tem origem grega onde a palavra *mykes* significa fungo e no latim *toxicum* refere-se à toxina ou fungo tóxico (BULLERMAN, 1999). Estas substâncias são diversos metabólitos de baixa massa molecular, produzidos por fungos, porém são estruturalmente diversas. Após a descoberta das aflatoxinas em amendoins na década de 1960, as pesquisas de micotoxinas em alimentos cresceram e então foram descobertos mais de 100 fungos toxigênicos e mais de 300 micotoxinas (SHENG *et al.*, 1999; TURNER *et al.*, 2009).

As micotoxinas apresentam diferentes efeitos biológicos. Elas podem ser carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas, estrogênicas, hemorrágicas, imunotóxicas, nefrotóxicas, hepatotóxicas, dermatotóxicas e neurotóxicas. As doenças causadas por estas substâncias são chamadas de micotoxicoses. A natureza global destas micotoxicoses é baseada em doenças humanas bem documentadas como o ergotismo na Europa que é a provavelmente a micotoxicose conhecida mais antiga, aflatoxicoses agudas no sul e leste da Ásia e aleucia alimentar tóxica (ATA) na Rússia (STEYN, 1995).

Em um importante trabalho publicado pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*), aflatoxinas, desoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxina e zearalenona foram consideradas as cinco micotoxinas que apresentam maior risco a saúde humana e animal (IARC, 1993).

Existem vários fatores que apresentam influência sobre a integridade do alimento, um exemplo comum é o clima. Esta influência climática pode apresentar impacto sobre a segurança do alimento desde a produção primária até o consumo por afetar todos os componentes da tríade epidemiológica, hospedeiro, agente e ambiente (TURNER *et al.*, 2009; TIRADO *et al.*, 2010).

Mesmo com o alto número de micotoxinas já conhecidas, apenas 20 são conhecidas por ocorrência em alimentos com níveis e frequência significativa para apresentar riscos à segurança alimentar. Existem cinco fungos que são os principais produtores destas micotoxinas: *Claviceps*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (STEYN, 1995).

Leveduras e fungos são encontrados em uma variedade de condições ambientais devido a sua capacidade de utilizar vários substratos e de tolerar valores baixos de pH, baixa atividade-água e baixas temperaturas, por isso a contaminação por micotoxinas pode ocorrer tanto em regiões temperadas como em tropicais, dependendo da espécie fúngica em questão. Os alimentos apresentam nutrientes essenciais para o crescimento fúngico, como os carboidratos, então é comum a contaminação destes, ocorrendo a deterioração (GARCIA *et al*, 2009; TURNER *et al*, 2009).

Não é obrigatório que quando exista a presença de fungos no alimento exista também a ocorrência de micotoxina, pois nem todos os fungos são toxigênicos e nem sempre as condições do alimento são favoráveis para a produção da mesma. Existe ainda a produção por fungos de substâncias utilizadas em prol da saúde, como a penicilina, antibiótico muito utilizado (BINDER *et al*, 2007).

As micotoxinas são quimicamente e estruturalmente diversas, porém a maioria é sintetizada por reações de biossíntese simples a partir de moléculas como acetato, piruvato e outros, após a fase de crescimento balanceado do fungo. Durante certo tempo este fato foi considerado estranho devido aos diversos efeitos tóxicos apresentados por micotoxinas (TURNER *et al*, 2009). Existem evidências para indicar que quanto maior a complexidade do caminho de síntese de uma micotoxina, menor a quantidade de espécies capaz de produzir a mesma (D'MELLO *et al.*, 1997).

1.4 Aflatoxinas

Em 1960, após a morte de mais de 100.000 perus com necrose aguda do fígado e hiperplasia do ducto biliar devido à contaminação por aflatoxinas, estas

substâncias foram isoladas, caracterizadas e rastreadas em farelos de amendoim consumidos por esses animais e então foram identificadas como a causa da doença X do peru. Estas toxinas são produzidas principalmente por fungos da espécie *Aspergillus* e é baseado nisso que recebe o nome de aflatoxina, que significa A-flavus-toxins (D'MELLO *et al.*, 1997; HUSSEIN e BRASEL, 2001).

As AFs são o grupo de micotoxinas mais estudados, com mais de 5000 publicações. Existem mais de 20 aflatoxinas já conhecidas, porém as de maior importância deste grupo são AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. Destaca-se a AFB1 entre as principais AFs devido a sua atividade carcinogênica em animais. Existem também as AFM, metabólitos hidroxilados das AFB encontradas primeiramente em tecidos animais e fluidos como leite e urina (HUSSEIN e BRASEL, 2001; RICHARD, 2007; ZAIN, 2011).

As propriedades biológicas das AFs estimulam constantes pesquisas para a elucidação de seus mecanismos molecular e celular, especialmente devido ao efeito carcinogênico. As AFs (FIGURA 1) são grupos diidrofurano ou tetraidrofurano fundidos a um anel de cumarina. Essas moléculas apresentam fluorescência sob a luz ultravioleta e são caracterizadas por esta propriedade. As AFB apresentam fluorescência azul enquanto as AFG apresentam fluorescência verde, e por isso são assim chamadas (STEYN, 1995; HUSSEIN e BRASEL, 2001).

As aflatoxinas comumente contaminam commodities agrícolas e animais de produção, apresentando-se diretamente relacionadas ao aumento de mortalidade dos mesmos. Esta contaminação causa uma grande perda econômica por reduzir significativamente o valor dos grãos, dos animais e dos produtos exportados e produzidos por eles, além de causar impacto sobre a saúde humana e animal (RODRIGUES *et al.*, 2009; ZAIN, 2013).

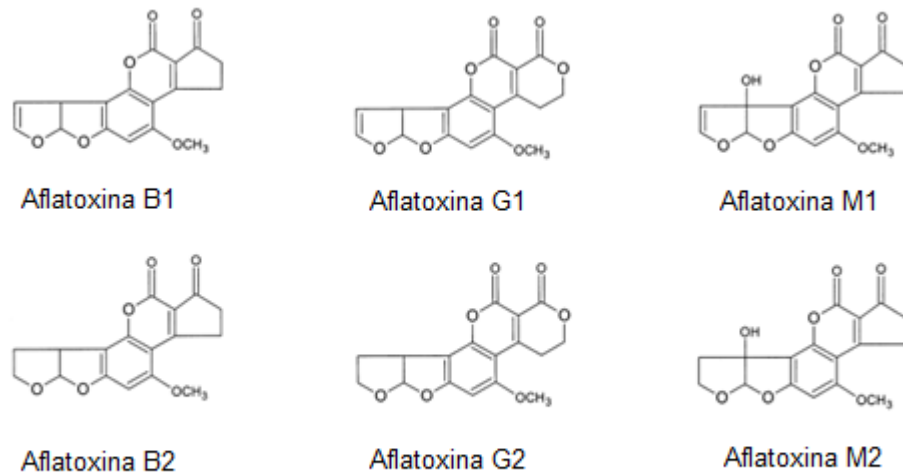


FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 e AFM2 (HUSSEIN, BRASEL, 2001)

1.5 Fungos produtores de aflatoxinas

Os principais fungos produtores de aflatoxinas são os do gênero *Aspergillus*, características particulares quanto à taxonomia dividem este gênero em sessões. Entre essas sessões encontram-se *Fumigati*, *Circumdati*, *Nigri* e a sessão *Flavi* que apresenta os dois maiores produtores de aflatoxinas, o *A. flavus* e o *A. parasiticus* (SAMSON, HONG e FRISVAD, 2006).

É comumente aceito que *A. parasiticus* possui uma maior quantidade de cepas produtoras das 4 principais aflatoxinas enquanto cepas de *A. flavus* comumente produzem AFB1 e AFB2, porém ele também produz ácido ciclopiazônico, micotoxina encontrada junto as aflatoxinas nos amendoins que causaram a morte dos perus em 1960. Em ambas as espécies existem cepas não aflatoxigênicas (D'MELLO *et al.*, 1997).

Em 1965, Raper e Fennell alegaram que o *Aspergillus* sessão *flavi* é composto por nove espécies e duas variações baseando-se na coloração e organização dos conídios. Em 2006 verificou-se que três espécies apresentam conídios com coloração do amarelo ao ocre e 12 espécies contém conídios com cor do verde ao marrom, incluindo *A. flavus* e *A. parasiticus*. (SAMSON, HONG e FRISVAD, 2006).

Dentro da sessão flavi, o *A. nomius* também tem sido descrito como um potente produtor de aflatoxinas, porém encontrado com menor frequência. Esta dificuldade para identificar *A. nomius* pode ocorrer devido a sua forte semelhança com o *A. flavus*, podendo apresentar possíveis erros na diferenciação e classificação da espécie. A organização da parede dos conídios é considerada como fator primário para a diferenciação entre *A. parasiticus* e *A. flavus*. Os conídios de *A. parasiticus* são esféricos e com projeções na forma de espinhos enquanto os conídios de *A. flavus* possuem paredes relativamente delgadas e rugosas, e sua forma pode variar de esférica à elíptica. *A. nomius* apresenta semelhança morfológica com o *A. flavus*, mas os conídios apresentam-se mais ásperos (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Junto a análise morfológica para a caracterização dos fungos em questão, devem-se realizar testes bioquímicos para identificar os metabólitos produzidos. Apesar dos três produzirem aflatoxinas, existe a produção de outras substâncias como ácido ciclopiazônico, ácido kójico e ácido aspergílico, conforme QUADRO 1 (MATELES e ADYE, 1965).

Espécies	Aflatoxinas		Ácido kójico	Ácido ciclopiazônico	Ácido aspergílico	Crisogina	Parasitolídeo
	B	G					
<i>A. parasiticus</i>	+	+	+	-	+	-	+
<i>A. nomius</i>	+	+	+	-	+	+/-	-
<i>A. flavus</i>	+/-	-	+	+	+	-	-

QUADRO 1 - MICOTOXINAS PRODUZIDAS POR ESPÉCIES DE *Aspergillus* (SAMSON, HONG e FRISVAD, 2006)

1.6 Toxicocinética

Devido ao baixo peso molecular, as aflatoxinas apresentam certa facilidade em serem absorvidas após a ingestão por via oral. Elas são absorvidas por difusão passiva no intestino delgado sendo que no duodeno existe maior absorção. As aflatoxinas estão sujeitas a processos de biotransformação já na mucosa do trato gastrointestinal devido à presença de CYP450 3A4 no intestino delgado, formando

principalmente 8,9-epóxido, o diidrodiol e a aflatoxina B2 α (GUENGERICH *et al*, 1998; MACHINSKI JUNIOR 2008)

Após a absorção, as aflatoxinas e os possíveis produtos da biotransformação chegam ao fígado através do sistema portal hepático, onde são concentradas devido à alta permeabilidade que esta toxina apresenta a membrana dos hepatócitos. No fígado elas são bioativadas (FIGURA 2) pelo citocromo P450, etapa importante para o potencial carcinogênico que estas moléculas apresentam (CORCUERA, 2012). Através do citocromo P450, a AFB é ativada nos microsomos por mono-oxigenases de função mista, utilizando NADPH e oxigênio molecular para formar o reativo carcinogênico 8,9-epóxido (McLEAN, 1995).

É importante ressaltar que entre os epóxidos formados, apenas o isômero *exo* apresenta genotoxicidade, acredita-se que esta exigência ocorra devida a reação SN2 com o átomo N7 da guanina do DNA e também pela geometria favorável para a intercalação entre as bases. O CYP450 3A4 parece ser dominante na formação do isômero *exo* do AFB epóxido, mas o CYP450 1A2 também é capaz de formar este isômero e este parece apresentar grande afinidade pela AFB1 (GUENGERICH *et al*, 1998).

Entre as proteínas plasmáticas, a única que se liga de forma significativa à AFB1 é a albumina. Ocorre uma ligação covalente entre a lisina da albumina e a AFB1, porém a conjugação que ocorre com maior frequência é com a glutathione (QUIAN *et al*, 2013). A formação desse conjugado é mediada pela glutathione-S-transferase (GST) e ele é primeiramente excretado pela bile. Existem outras vias de detoxificação para o epóxido da AFB1, como a UDP-glucuronil-transferase, sulfotransferase e o sistema epóxidohidrolase (McLEAN, 1995). O sistema epóxidohidrolase ocorre com menor frequência que a hidrólise não enzimática. A reação enzimática apresenta uma velocidade limitada de acordo com um intermediário acil-enzima (GUENGERICH, 1998).

A AFB1 ou seus epóxidos podem ainda ser hidroxilados formando AFM1 e AFQ1 ou ainda ser desmetilada e formar AFP1. Os outros tipos de aflatoxinas, geralmente são conjugadas com sulfatos ou ácido glucurônico para serem excretados. A excreção das aflatoxinas e seus produtos de biotransformação do organismo ocorrem por diferentes vias, a principal forma de secreção é a biliar

(58%), mas também existe a secreção urinária (35%). Existe também uma fração significativa de AFM secretada no leite em lactentes e animais com lactação (McLEAN,1995; MACHINSKI JUNIOR, 2008).

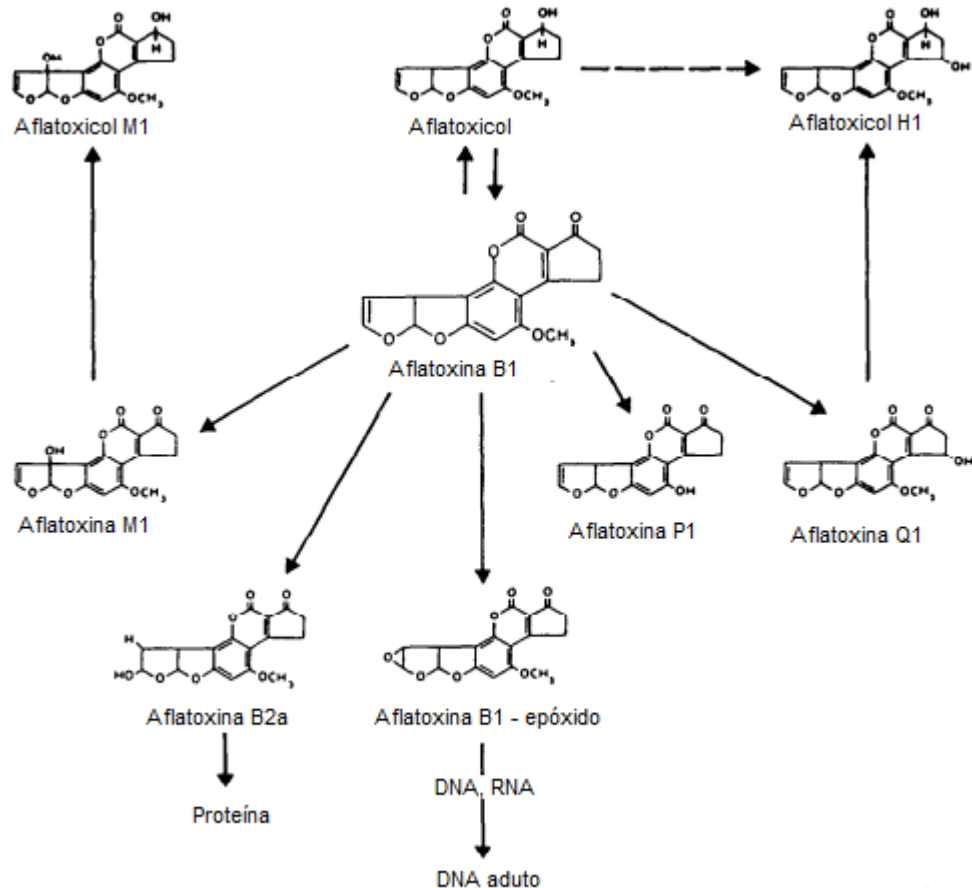


FIGURA 2 - METABOLISMO DA AFLATOXINA B1 (McLEAN e DUTTON, 1995)

1.7 Toxicodinâmica

As aflatoxinas, em especial a AFB1, são importantes toxinas cancerígenas e genotóxicas. O câncer com maior ocorrência devido a exposição de aflatoxina é o câncer de fígado, sendo a AFB1 a substância hepatocarcinogênica mais potente experimentalmente conhecida. Liu e colaboradores (2012) constataram que 5-28% dos casos de hepatocarcinoma celular podem ser atribuídos a exposição do organismo a aflatoxinas (ASIM *et al.*, 2011).

O carcinoma hepatocelular representa aproximadamente 9,2% dos novos casos de câncer no mundo em 2013 e este número segundo projeções tende a aumentar a cada ano que passa. Este câncer é o quinto mais comum em homens e o sétimo em mulheres e ocorre principalmente em jovens e em regiões com recursos limitados. O tumor no fígado apresenta um grave prognóstico, pois é o terceiro câncer com maior taxa de mortalidade anual, e 93% dos pacientes morrem com 12 meses do início dos sintomas (KEW, 2013).

A real causa do hepatocarcinoma por exposição à AF é o produto gerado pela biotransformação realizada pelo CYP450, envolvendo as enzimas CYP450 3A4, 3A5, 3A7 e 1A2 (KAMDEM *et al*, 2006). Este produto de biotransformação é o 8,9-exo-epóxido que é altamente reativo com DNA, RNA e proteínas, causando significativa inibição do RNA, de síntese de proteínas e também inibindo a atividade de enzimas metabolizadoras de drogas. Existe também o 8,9-endo-epóxido, porém este produto de biotransformação não possui a mesma capacidade que o 8,9-exo-epóxido de reação com estas moléculas (YANG, 1997; HABIB *et al.*, 2006; KEW, 2013).

Este produto de biotransformação reativo liga-se ao DNA para formar o promutagênico 8,9-dihidro-8-(N-7-guanil)-9-hidroxi AFB1 aduto (AFB1-N7-Gua), que também pode se transformar em duas substâncias secundárias, sendo umas delas a AFB1-formamidopirimidina aduto (AFB1-FABY) que é mais estável. Este adutos tem a capacidade de realizar uma mutação na terceira base do códon 249 do gene p53 (gene supressor de tumor), substituindo uma guanina por uma timina, então o códon é transformado de AAG para AAT. O aduto AFB1-FABY realiza a mutação de guanina para timina 6 vezes mais que o aduto AFB1-N7-Gua (GOUAS *et al.*, 2009; KEW, 2013).

O gene p53 é responsável pela regulação de vários componentes do controle de danos ao DNA e por promover o envelhecimento celular (senescência). A resposta a mutação no gene p53 depende principalmente do local e da natureza do ponto de mutação. Mutações nos códons 157, 248 e 273 são locais de formação de aduto para o agente cancerígeno benzo-a-pireno, encontrado na fumaça de cigarros, produto de ligação que está relacionado com câncer nos pulmões. Estas alterações no gene p53 causam uma condição de estresse celular que vão induzir a expressão

de genes que regulam a síntese e reparação de DNA, a possível parada do ciclo celular, a diferenciação celular e a apoptose (CHAN *et al.*, 2003; HABIB *et al.*, 2006).

1.8 Alimentos contaminados por aflatoxinas

Existem muitas micotoxinas já conhecidas, porém poucas são as encontradas regularmente em alimentos. Na dieta normal de humanos, a exposição a diferentes micotoxinas é possível, principalmente em baixas concentrações e com certa frequência, o que muitas vezes apresenta danos mais graves a saúde do que uma intoxicação aguda. Na dieta comum dos brasileiros existem vários alimentos passíveis de contaminação por micotoxinas, como grãos e cereais, que apresentam baixos níveis de contaminação, porém com frequência, favorecendo assim a intoxicação crônica, uma vez que estes alimentos são frequentemente consumidos pela população brasileira. A FAO estimou que mais de 25% de alimentos no mundo são contaminados por micotoxinas. O risco de contaminação por micotoxinas é uma grande preocupação quanto à segurança alimentar, principalmente de grãos e outros produtos agrícolas (WHO, 1999; KUMAR, BASU e RAJENDRAN, 2008).

1.8.1 Amendoim

Após a colheita dos amendoim (*Arachis hypogaea* L.), os grãos são secos por processos de secagem naturais e artificiais até a redução máxima de umidade para que a segurança do alimento esteja preservada. No final dos anos 70, acreditava-se que a contaminação por aflatoxinas em amendoins era consequência principalmente de más condições de secagem e armazenamento, porém após várias pesquisas, descobriu-se que condições climáticas durante o cultivo também podem ser responsáveis por essa contaminação (COLE, 1989).

A contaminação pré-colheita é considerada a mais significativa razão de contaminação por aflatoxinas em amendoim. Esta contaminação por aflatoxinas é um dos maiores problemas de agricultura, principalmente em regiões semiáridas. Solos arenosos são suscetíveis ao cultivo de amendoim, porém também são ótimos

para o crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus* (COLE, 1989; KUMAR, BASU e RAJENDRAN, 2008).

O modo e extensão da invasão do cultivo dependem da densidade de esporos no solo, da umidade do solo e da temperatura do solo durante o desenvolvimento do amendoim até a forma madura. A presença desta contaminação não afeta o rendimento da colheita, porém apresentam danos econômicos e também riscos a saúde de humanos e animais caso ocorra a ingestão destes produtos (KUMAR, BASU e RAJENDRAN, 2008).

1.8.2 Milho

O milho (*Zea mays* L.) é um ótimo substrato para a produção de micotoxinas potencialmente perigosas para a saúde humana e animal (KPODO *et al*, 2000). As espécies de *Aspergillus* são colonizadores importantes em milho e dentre essas espécies as principais que crescem e produzem aflatoxinas são *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (GALATI, GIANNUZI e GINER, 2011).

Para produtos a base de milho, a primeira etapa de produção realizada é a moagem. Além de afetar o rendimento e a composição dos grãos devido à quebra física dos núcleos, a moagem também apresenta impacto sobre os níveis de micotoxinas, aumentando a contaminação (BURGER, 2013).

A primeira epidemia por milho contaminado com AF foi relatada na Índia em 1975, quando os Bhils (segundo maior grupo tribal distribuído pelo país) estavam consumindo milho contaminado com *A. flavus*. Em torno de 400 pessoas foram afetadas durante esta epidemia (KUMAR, BASU e RAJENDRAN, 2008).

Foi relatado também que as amostras de milho cultivadas em estações chuvosas apresentam uma maior incidência de AF do que as cultivadas em estações secas. Esta diferença entre as estações deve-se a dificuldade que os agricultores apresentavam de reduzir os níveis de umidade do milho para tornar o produto seguro, aumentando assim a probabilidade de contaminação por fungos (JANARDHANA *et al.*, 1999).

1.8.3 Arroz

Entre os mais importantes alimentos básicos do mundo esta o arroz (*Oryza sativa* L.). O cultivo do arroz geralmente é realizado em regiões quentes e úmidas como as regiões subtropicais. O arroz passa por processos de secagem após a colheita, porém devido a condições inadequadas de armazenamento, ele pode ser um substrato ideal para o crescimento fúngico. Mesmo com as muitas pesquisas que relatam a alta contaminação de arroz por fungos e aflatoxinas, o arroz quando comparado a outros cereais, não é o que apresenta com maior frequência a contaminação por fungos produtores de micotoxinas (LAI *et al.*, 2014).

Em muitos países as pesquisas de micotoxinas em arroz são rotineiramente realizadas, porém no Brasil são muitos os estudos que demonstram os altos níveis e incidências destas substâncias neste alimento. A alta frequência de contaminação neste cereal apresenta um importante problema de saúde pública brasileira, pois o arroz faz parte do hábito alimentar brasileiro devido ao seu alto consumo em diferentes formas (SILVA *et al.*, 2008).

Geralmente, o arroz é consumido na forma parbolizada. O processo de parbolização comumente causa o amolecimento do grão de arroz e a abertura da casca, condições que facilitam a entrada do fungo e a produção de AF caso o processo de secagem não seja realizado de forma adequada (KUMAR, BASU e RAJENDRAN, 2008).

1.8.4 Trigo

A farinha de trigo (*Triticum sativum* L.) é um dos mais importantes alimentos na cultura americana e europeia devido a sua participação em várias receitas características destas regiões como pão, massa, biscoito e bolo. Além da utilização do trigo na alimentação humana, 40% dos grãos são utilizados para alimentação animal (ARMORINI, 2015; KRNJAJA, 2015).

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, um total de 655,27 milhões de toneladas de trigo foram produzidos e 680,419 milhões de toneladas de trigo foram consumidas no período de 2012-2013 no mundo. O farelo

de trigo, que apresenta uma quantidade significativa de descarte durante o processo de produção de farinha de trigo, é um dos resíduos agro-industriais mais utilizados por pesquisadores para a obtenção de metabólitos por fermentação em estado sólido (DEMIR e TARI, 2014).

O trigo é suscetível à contaminação por fungos produtores de micotoxinas durante o seu cultivo, colheita, transporte e armazenamento. A microbiota de trigo é dominada por espécies de *Aspergillus* seção Nigri e Flavi, o que favorece a presença de micotoxinas, entre elas a aflatoxina (GIRAY *et al*, 2007; RIBA *et al*, 2012).

1.8.5 Feijão

A pesquisa de micotoxinas em cereais em vários países é comumente focada em cereais enquanto a pesquisa em feijão (*Phaseolus vulgaris* L) é limitada (DOMIJAN *et al.*, 2005).

Em estudos realizados na Croácia a micotoxina encontrada com maior frequência no feijão foi a ocratoxina A e os fungos produtores de micotoxina encontrados foram *Penicillium spp.* e *Aspergillus spp.* Com tudo sabe-se que os dois fungos são também produtores de outras aflatoxinas como patulina e aflatoxina (DOMIJAN *et al.*, 2005).

Quando o feijão está contaminado as aflatoxinas prejudicam a divisão celular e bloqueia a síntese de clorofila, o que compromete o crescimento da planta e pode causar a morte da planta (SILVA *et al.*, 2002).

1.9 Fatores que influenciam na produção de aflatoxina

Em relação à segurança dos alimentos, a única substância química que apresenta riscos aos alimentos são as micotoxinas (GARCIA *et al*, 2009). A presença de fungos nos alimentos não implica necessariamente na presença de micotoxinas, principalmente devido a fungos fazerem parte da microflora de alimentos e cultivos. Sabe-se que quase todos, ou todos os problemas relacionados

à contaminação de alimentos por micotoxinas deve-se a interação entre as práticas agrônômicas, a presença de fungo produtor de micotoxinas e fatores biofísicos (BINDER *et al*, 2007; TIRADO *et al*, 2010). Os níveis de produção de micotoxinas vão depender de fatores físicos, químicos e biológicos durante as fases de cultivo, manuseamento e armazenamento do alimento conforme o QUADRO 2 (BRYDEN, 2012).

Fatores físicos	Fatores químicos	Fatores biológicos
Umidade	Dióxido de carbono	Variedade vegetal
Temperatura	Oxigênio	Estresse
Umidade relativa	Composição do substrato	Insetos
Danos mecânicos	Pesticidas e fungicidas	Quantidade de esporos

QUADRO 2 – Fatores que influenciam na produção e nos níveis de micotoxinas em alimentos (BRYDEN, 2012)

Existem vários fatores que apresentam influência sobre a integridade do alimento, um exemplo comum é o clima. Esta influência climática pode apresentar impacto sobre a segurança do alimento desde a produção primária até o consumo por afetar todos os componentes da tríade epidemiológica, hospedeiro, agente e ambiente. Comumente, alimentos que são armazenados por mais que alguns dias são possíveis alvos para o crescimento fúngico e contaminação por micotoxinas (TURNER *et al*, 2009).

Leveduras e fungos são encontrados em uma variedade de condições ambientais devido a sua capacidade de utilizar vários substratos e de tolerar valores baixos de pH, baixa atividade-água e baixas temperaturas, por isso a contaminação por micotoxinas pode ocorrer tanto em regiões temperadas como em tropicais, dependendo da espécie fúngica em questão, como o *Aspergillus*, que pode tolerar condições com menores taxas de atividade-água do que o *Fusarium*, e então é encontrado com maior frequência em alimentos contaminados. A presença de nutrientes essenciais nos alimentos, como os carboidratos, é essencial para o crescimento fúngico, então é comum a contaminação destes, ocorrendo assim a sua deterioração (TURNER, SUBRAHMANYAM e PILETSKY, 2009; BRYDEN, 2012).

Alimentos que são armazenados por mais que alguns dias geralmente são possíveis alvos para o crescimento fúngico e contaminação por micotoxinas, que podem ocorrer tanto em regiões temperadas como em tropicais, dependendo apenas da espécie fúngica. Isso ocorre devido ao maior tempo de exposição a condições consideradas de estresse em que estes alimentos ficam, apresentando maior contato com estes fatores que favorecem a contaminação (TURNER *et al*, 2009).

1.10 Legislação

Entre os fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático está o consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas, portanto as aflatoxinas são consideradas um problema de saúde pública. Devido a isso, diversos países estabeleceram limites de aceitação de presença de aflatoxinas em produtos de consumo humano. Os limites estabelecidos para aflatoxinas são geralmente detalhados e específicos para diferentes gêneros de alimentos, e comumente são estabelecidos limites para aflatoxinas totais, aflatoxina B1 e aflatoxina M1 em leite e produtos derivados. A FAO realizou uma comparação entre os limites para micotoxinas em 1995 e 2003. O limite para aflatoxina totais (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) apresenta um maior número de países com valores regulamentados, totalizando 76 países, enquanto limites para aflatoxina B1 existem em 61 países e para aflatoxina M1 em leite existem em 60 países (FAO, 2003).

O limite de 4µg/kg para aflatoxinas totais é regulamentado em 29 países, e todos os países da União Europeia adotam este limite. Para os países da América Latina, o limite regulamentado é de 20µg/kg, este valor é harmonizado pelo MERCOSUL, assim como os limites da União Europeia (FAO, 2003).

Os níveis de tolerância máxima para aflatoxina B1 não apresentaram grandes variações de 1995 para 2003, porém houve uma diminuição nos valores limites. Em 29 países (FIGURA 3) o valor limite é 2µg/kg, a maioria destes países fazem parte da União Europeia, que apresenta limites regulamentados entre os países membros. O limite de 5µg/kg é determinado para 21 países (FIGURA 4), incluindo países da América Latina (FAO, 2003).

Para os limites de aflatoxina M1 em leite, o limite permitido com maior frequência é 0,05µg/kg, valor estipulado por 34 países (FIGURA 5). O limite de 0,5µg/kg é adotado por 22 países, dentre eles estão os países do MERCOSUL (FAO, 2003).

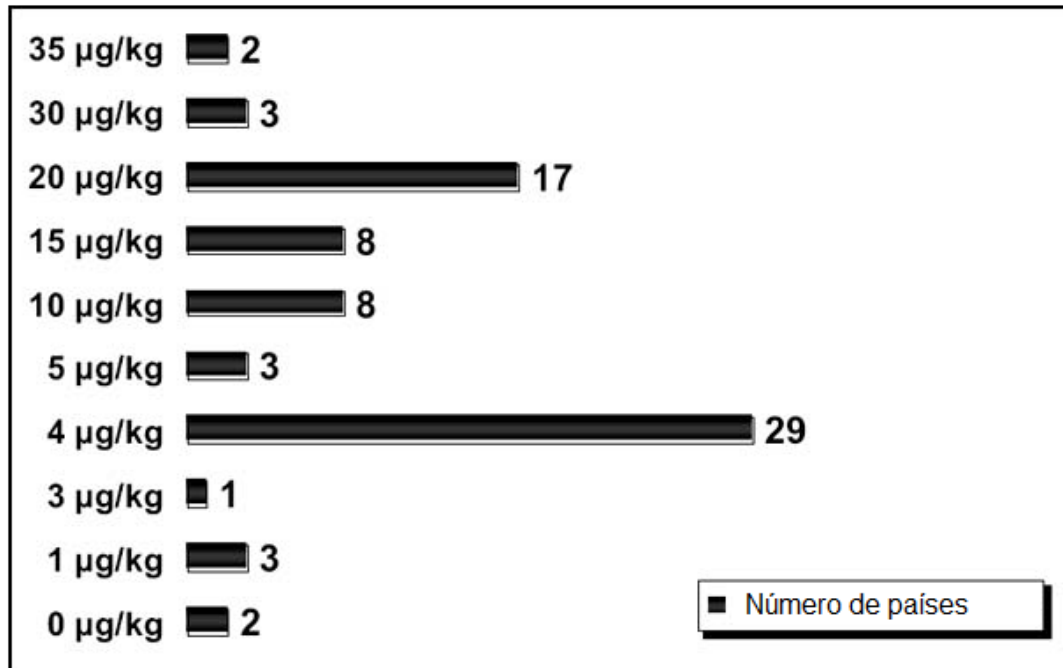


FIGURA 3 – LIMITE MUNDIAL PARA AFLATOXINAS TOTAIS EM ALIMENTOS (FAO, 2003)

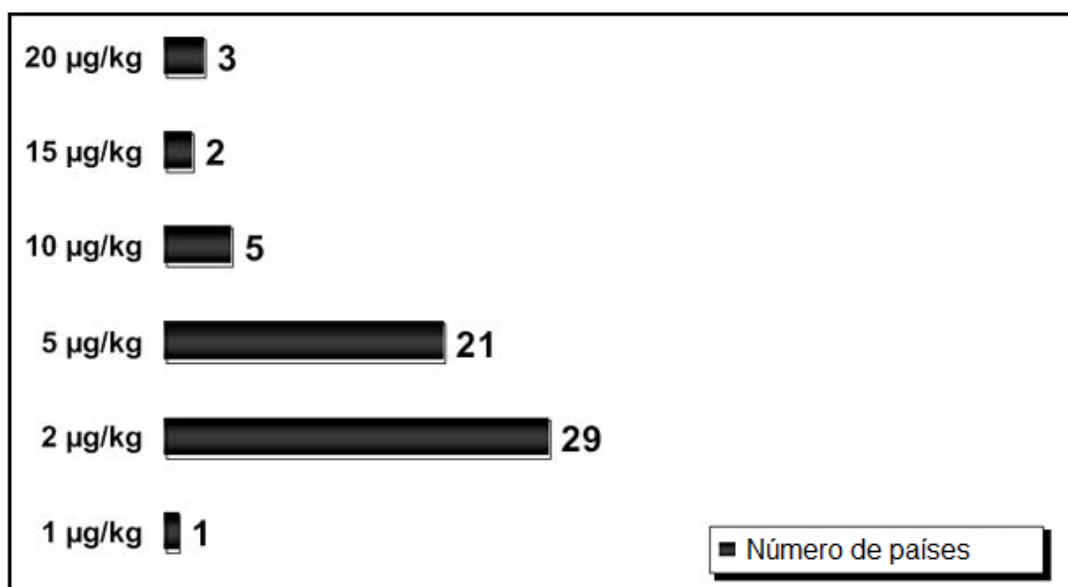


FIGURA 4 – LIMITE MUNDIAL PARA AFLATOXINA B1 EM ALIMENTOS (FAO,2003)

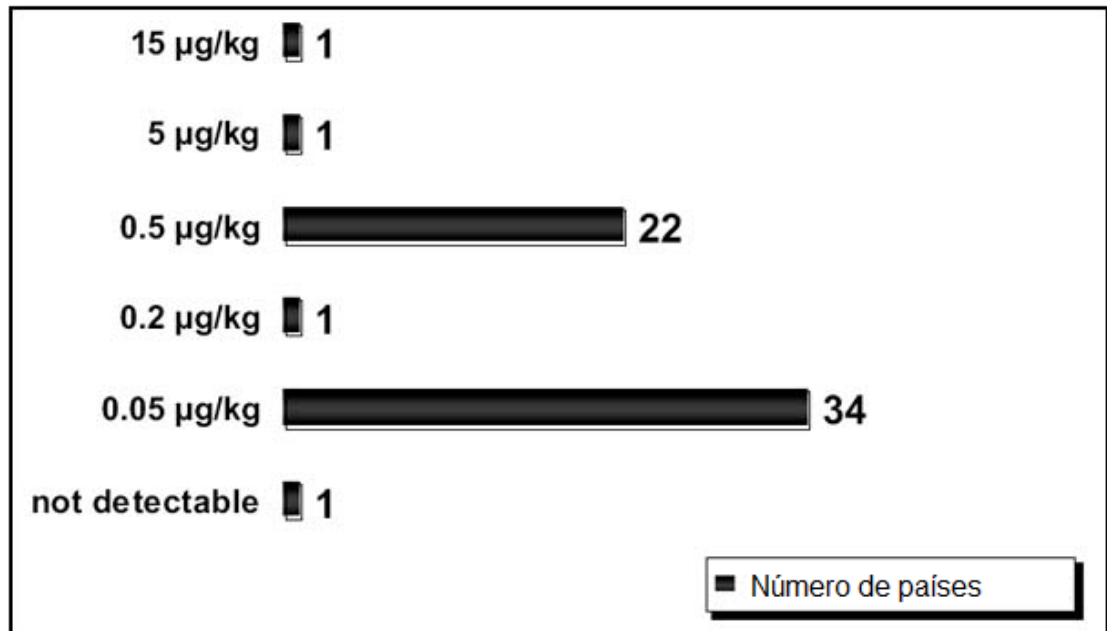


FIGURA 5 – LIMITE MUNDIAL PARA AFLATOXINA M1 EM LEITE (FAO, 2003)

Brasil, 17 anos após a descoberta das aflatoxinas, estabeleceu o limite de 30µg/kg para o total de AFB1 e AFG1 em produtos de consumo humano, conforme a Resolução n. 34/76 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1977). Após 19 anos, o Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária estabeleceu na portaria nº 183 de 1996, aprovada pela resolução n. 56/94, o limite de 20µg/kg para o total de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 (BRASIL, 1996). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu o limite de 20µg/kg para aflatoxinas em amendoim, pasta de amendoim e milho e farinha de milho; 0,5µg/kg de aflatoxina M1 em leite fluido e 0,5µg/kg de aflatoxina M1 em leite em pó, através da RDC nº. 274 de 15 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002). Recentemente, a ANVISA através da RDC nº. 7 de 18 de fevereiro de 2011, estabeleceu novos limites máximos toleráveis para aflatoxinas em diferentes produtos de consumo humano conforme mostra o QUADRO 3 (BRASIL, 2011).

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
AFM1	Leite fluído	0,5
	Leite em pó	5
AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Especiarias: <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); <i>Piper</i> spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada) <i>Zingiber officinale</i> (gengibre) <i>Curcuma longa</i> (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20

QUADRO 3 - LIMITE MÁXIMO DE TOLERÂNCIA DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS (FONTE: BRASIL, 2011)

1.11 Relatos de casos de intoxicações agudas e crônicas por aflatoxinas

Fungos produtores de aflatoxinas podem contaminar o produto em todas as fases da cadeia produtiva do alimento, desde o campo, durante a colheita, transporte, armazenamento e processamento de alimentos e rações. Neste processo produtivo desencadeia-se o crescimento fúngico e a produção das aflatoxinas. Uma vez produzida esta micotoxina ela é extremamente estável a altas temperaturas e processamento do alimento, desta forma permanece neste alimento até seu consumo pelos humanos ou animais (WU *et al*, 2011).

Decorrentes desta estabilidade e do consumo destes alimentos, os efeitos adversos das aflatoxinas em animais (e presumivelmente em humanos) foram classificados em duas formas gerais:

A. aflatoxicose aguda que é produzida quando moderados a elevados teores de aflatoxinas são consumidos. Em episódios específicos agudos da doença pode acontecer hemorragia, dano agudo do fígado, edema, alteração na digestão, absorção e / ou metabolismo de nutrientes e, eventualmente, morte.

B. aflatoxicose crônica que é o resultado da ingestão de níveis baixos a moderados de aflatoxinas. Os efeitos são geralmente subclínicos e difíceis de reconhecer. Alguns dos sintomas comuns são prejudicados pelo consumo alimentar e taxas mais lentas de crescimento com ou sem a produção de uma síndrome de aflatoxina evidente (WU *et al*, 2011).

Um dos relatos mais importantes da aflatoxicose em humanos foi feito em mais de 150 aldeias em distritos adjacentes de dois estados vizinhos, no noroeste da Índia, no outono de 1974. De acordo com um relatório deste surto, 397 pessoas foram afetadas e 108 pessoas morreram. Neste surto, milho contaminado foi o principal componente da dieta, e os níveis de aflatoxina encontrados foram de 0,25 a 15 mg/kg. A ingestão diária de aflatoxina B1 foi estimada em pelo menos 55 ug/kg de peso corporal durante um número indeterminado de dias. Os pacientes apresentaram febre alta, icterícia progressiva e rápida, edema dos membros, dor, vômitos e fígados inchados. Um investigador relatou uma característica peculiar e muito notável da epidemia: o aparecimento de sinais de doença em uma população da aldeia foi precedida por uma doença semelhante em cães domésticos, que era

geralmente fatal. O exame histopatológico em humanos mostrou extensa proliferação do ducto biliar e fibrose periportal no fígado junto com hemorragias gastrointestinais. O acompanhamento durante dez anos do surto na Índia encontrou os sobreviventes totalmente recuperados, sem efeitos nocivos da experiência (FDA, 2013).

Um segundo surto de aflatoxicose foi relatado no Quênia em 1982. Havia neste momento 20 internações em um hospital com uma mortalidade de 60%. A ingestão diária de aflatoxina foi estimada como sendo pelo menos de 38 ug/kg de peso corporal por um número indeterminado de dias (FDA, 2013).

Em fevereiro-março 2013 vários países europeus, incluindo a Romênia, a Sérvia e a Croácia relataram a contaminação de um grande lote de leite para consumo humano (e, possivelmente, de produtos derivados) com aflatoxinas. Os detalhes são escassos e o caso não foi divulgado pela mídia. Foi relatado em março de 2013, que alimentos originários da Sérvia e importados pela Holanda e Alemanha foram contaminados. Também foi relatado que os testes revelaram contaminação no leite produzido por duas fazendas holandesas. O leite na Alemanha também foi testado, mas não estava contaminado. No entanto, a Rússia anunciou que iria proibir as importações provenientes de fazendas alemãs que receberam ração contaminada dos países já citados. Em 20 de março, os agricultores romenos despejaram toda sua produção de leite em protesto depois que o governo proibiu o leite de cinco fazendas. A Danone da Romênia também retirou cerca de 75 toneladas de produtos lácteos das prateleiras.

O maior caso de intoxicação por aflatoxinas documentado mundialmente ocorreu no Quênia em 2004 e resultou em 317 pacientes e 125 mortes, conforme relatado nas instalações médicas locais. Isto foi associado com o consumo de milho armazenado sob condições de umidade elevada (GIESEKER e CDC, 2004, LEWIS *et al.*, 2005).

As aflatoxicoses agudas, associadas a doses extremamente elevadas de aflatoxina, caracterizam-se por hemorragias, dano agudo do fígado, edema e morte em seres humanos. Condições que aumentam a probabilidade de aflatoxicose aguda em humanos incluem a disponibilidade limitada de alimentos, as condições ambientais que favorecem o desenvolvimento de fungos nas lavouras e a falta de

sistemas de regulação para o monitoramento de aflatoxinas e seu controle (WU *et al*, 2011).

Mesmo os casos mais divulgados sejam referentes a intoxicações agudas não se pode descartar os casos de intoxicações crônicas que podem levar em casos mais graves ao carcinoma hepatocelular. Os Centros de Controle de Doenças (CDC) estima que mais de 4,5 bilhões de pessoas nos países em desenvolvimento estão cronicamente expostos a toxinas produzidas por vários fungos, mas principalmente aflatoxinas em suas dietas (CDC, 2004).

Segundo Williams *et al.* (2004) a técnica mais utilizada ainda para se analisar a exposição crônica é a amostragem dos alimentos, tanto *in natura* como os alimentos processados e, desta forma, estabelecer qual o risco que a população está exposta ao consumir este tipo de alimentos contaminado com baixos teores de aflatoxinas.

Os dados sobre as condições de temperatura necessárias para a síntese das aflatoxinas; a vulnerabilidade dos alimentos à contaminação; os sistemas de produção de alimentos, armazenamento e comercialização e as falhas de regulação dos alimentos, indicam que há risco de exposição crônica aflatoxina entre 40° norte e sul do Equador nos países em desenvolvimento. Os dados populacionais do banco de dados da FAO indicam que são aproximadamente os 4,5 bilhões de pessoas vivem nesta zona, dados citados pelo CDC em 2004. A evidência de contaminação no mercado e amostras de alimentos e os dados dos biomarcadores humanos são indicadores de que a maior parte da população é susceptível de ser exposta (FIGURA 6), mas geralmente há um nível menor do que a necessária para a doença aguda e morte direta.

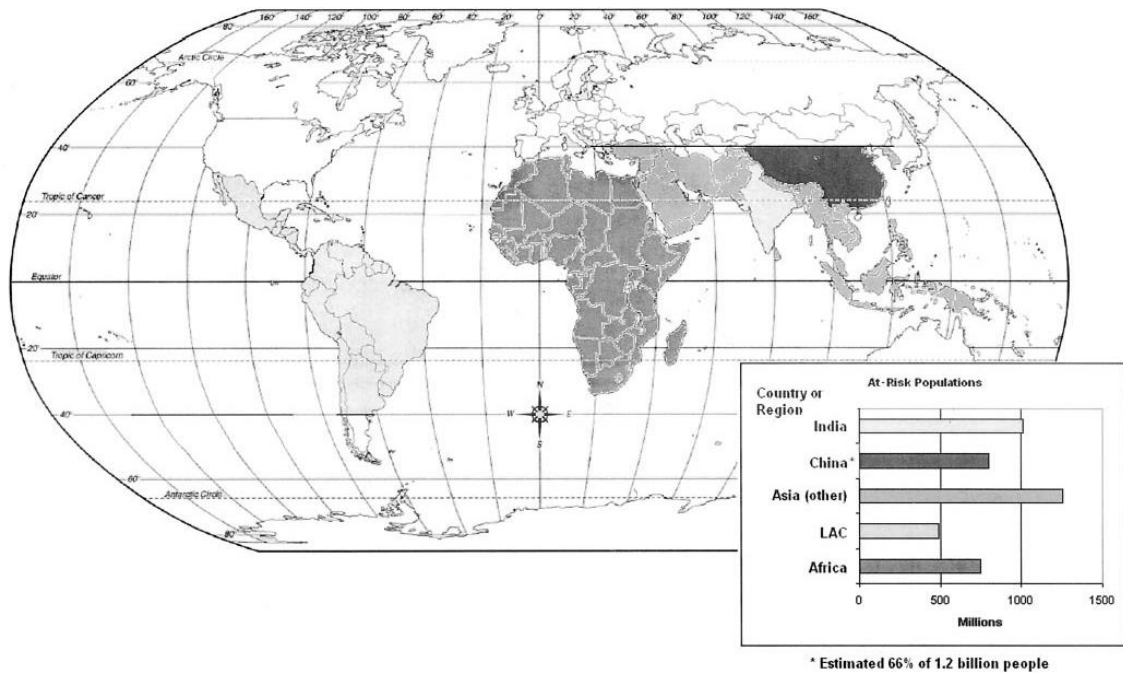


FIGURA 6 - ÁREAS E POPULAÇÕES DE RISCO DE EXPOSIÇÃO CRÔNICA À AFLATOXINA (FONTE: WILLIAMS *et al.*, 2004)

1.12 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido é um processo que envolve uma cultura microbiana que se desenvolve na superfície e no interior de uma matriz sólida com a ausência ou com mínimas concentrações de água livre, porém é importante que este sólido apresente umidade capaz de suportar o crescimento e metabolismo de microrganismos (VILLEGAS *et al.*, 1993; BARRIO-GONZÁLEZ, 2012).

A razão para o provável maior crescimento e metabolismo de microrganismos por fermentação em estado sólido ainda não é bem estabelecida, acredita-se que isso ocorre devido às condições da cultura apresentarem-se próximas do habitat natural. Vários fungos cultivados facilmente em processos de fermentação submersa apresentam a produção de certos metabólitos secundários apenas em substratos sólidos, o que torna a fermentação em estado sólido uma importante ferramenta para a pesquisa de novos metabólitos e também para o cultivo de fungos do tipo selvagem (PANDEY, 2003; HOLKER e LENZ, 2015).

Para a produção de metabólitos em fermentação em estado sólido existem vários parâmetros que devem ser testados e controlados, pois a otimização do

processo apresenta como resultado maiores concentrações do produto desejado. Entre esses parâmetros estão matriz sólida, temperatura, umidade, pH, microrganismo e outros (BELLON-MAUREL, ORLIAC e CHRISTEN, 2003).

A matriz sólida pode ser o substrato utilizado como fonte de nutrientes ou apenas um material inerte que esteja impregnado pelos nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo e para a produção do metabólito esperado. Entre as opções de matriz estão materiais sólidos de ocorrência natural como grãos, resíduo agroindustrial, como o farelo de trigo, e outros (PANDEY, 2003; SINGHANIA *et al*, 2009).

O volume de água considerado ótimo para a fermentação em estado sólido é quando o substrato está saturado, logo esta saturação varia de acordo com cada substrato, podendo variar entre 30 e 85%. Devido à baixa atividade-água acreditou-se que apenas fungos e leveduras poderiam ser utilizados nesse processo, pois bactérias exigem altos teores de água para seu crescimento, porém existem estudos de culturas de bactérias em fermentação em estado sólido que foram conduzidos com êxito (BELLON-MAUREL, 2003; PANDEY, 2003).

O controle do pH na fermentação em estado sólido é uma atividade difícil, uma vez que os eletrodos existentes não são capazes de medir o pH da forma sólida sem a presença de água livre. Para o possível controle desse parâmetro recomenda-se a utilização de um eletrodo potenciométrico ou de um eletrodo padrão após ressuspender o meio sólido em água destilada (BELLON-MAUREL, 2003).

A temperatura é um parâmetro clássico para ser trabalhado durante a fermentação em estado sólido e apresenta grande influência sobre o crescimento e desenvolvimento do microrganismo a ser cultivado. Durante a produção de metabólitos secundários, a temperatura é um sensor importante para ser medido e controlado principalmente quando em grandes escalas, uma vez que existe a liberação de calor metabólico aumentando a temperatura do sistema (BELLON-MAUREL, ORLIAC e CHRISTEN, 2003).

A principal vantagem da fermentação em estado sólido em relação à fermentação submersa é o diferente comportamento do fungo nos dois processos. Esta diferença ainda não é bem compreendida, mas são necessários estudos para uma melhor compreensão desse fato não apenas para o melhor controle desse

processo, mas também para a criação de novos métodos e tecnologias (BARRIOZ-GONZÁLEZ, 2012).

MATERIAL E MÉTODOS

1.13 Aquisição da cepa de fungo

A cepa NRRL 2999 foi adquirida no site <http://nrnl.ncaur.usda.gov/> do *National Center for Agricultural Utilization Research* em Peoria, Illinois, USA. A cepa utilizada possui um nível de segurança biológico 1, portanto não está associada com doenças em adultos humanos saudáveis, necessitando de um laboratório padrão com as devidas práticas de biossegurança.

1.14 Alimentos pesquisados

1.14.1 Alimentos pesquisados na fermentação em estado sólido

Os alimentos pesquisados neste trabalho como substratos para a fermentação (arroz branco, arroz cateto, farinha de trigo integral, milho e amendoim) foram adquiridos no comércio local e esterilizados em autoclave.

1.14.2 Alimentos pesquisados para a presença de aflatoxinas

Os alimentos pesquisados neste projeto (arroz, feijão, farinha de trigo, farinha de fubá, amendoim e milho) foram adquiridos no comércio local e testados para a presença de aflatoxinas.

1.15 Cultivo da cepa NRRL 2999 – *Aspergillus parasiticus*

A cepa foi cultivada no laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações do Departamento de Farmácia da UFPR.

O meio de cultura utilizado foi o ágar batata dextrose (PDA) com pH $5,0 \pm 0,2$. Para o crescimento do fungo, quebrou-se o frasco que continha o liofilizado da NRRL em um erlenmeyer de 25 mL contendo 5 mL caldo batata dextrose com pH $\pm 0,2$. O cultivo foi incubado a 24°C em um agitador orbital a 150rpm por 24 horas. Realizou-se o primeiro repique da cepa original para 2 tubos de ensaio contendo 14 mL de ágar batata dextrose e incubou-se na estufa a 28°C durante 4 dias. Realizou-se o segundo repique em 3 tubos de ensaio com 14 mL de PDA e incubou-se nas mesmas condições. Para armazenar o fungo cultivado, preparou-se 30 tubos de ensaio com 14 mL de PDA e realizou-se o 4º repique, incubou-se nas mesmas condições e após o período de incubação congelou-se os cultivos em um congelador a -20°C .

1.15.1 Ativação do fungo e suspensão de esporos

Para realizar os experimentos foi necessária a ativação do fungo. Para isso descongelou-se a temperatura ambiente dois cultivos do 4º repique, adicionou-se 1 mL de caldo batata dextrose e raspou-se os esporos com o auxílio de uma alça de platina. Transferiu-se 800 μL do cultivo para um frasco erlenmeyer de 25 mL com 10 mL de caldo batata dextrose e incubou-se a 28°C a 150rpm durante 24 horas. Após o período de incubação, transferiu-se 3 mL do cultivo para um frasco erlenmeyer de 250 mL com 30 mL de PDA fundido e deixou-se o frasco resfriar a temperatura ambiente. Posteriormente incubou-se na estufa a 28°C por 6 dias. Após o período de incubação, adicionou-se ao cultivo 20 mL de solução tween 80 a 0,5% (v/v) com 10 pérolas de vidro e uma barra magnética e colocou-se em agitação magnética durante 10 minutos para obter-se, deste modo, a suspensão de esporos.

1.16 Análise morfológica

Para analisar morfológicamente a cepa utilizada no trabalho, realizou-se o cultivo entre lâmina e lamínula. Para isso em uma placa de petri, foram colocadas duas lâminas, uma transversal a outra. Adicionou-se 200 μL de PDA em cada ponta das lâminas e 20 μL de suspensão de esporos e com o auxílio de uma pinça colocou-se sobre os meios uma lamínula. Entre as pontas das lâminas foram colocados

algodões com água para fornecer umidade ao cultivo. A placa de petri foi incubada a 28 °C durante 4 dias e posteriormente os cultivos foram analisados em microscopia óptica

1.17 Seleção do substrato para produção da aflatoxinas em meio sólido

1.17.1 Teste de absorção de água

Pesou-se 10 gramas dos seguintes alimentos: amendoim, milho, arroz branco, arroz cateto e farinha de trigo integral. Cada alimento foi colocado em um becker de 250 mL contendo 100 mL de água. Os beckers foram tampados com plástico filme e deixados em repouso. Após 24 horas filtrou-se a água e verificou-se com o auxílio de uma proveta quanto de água restava no frasco, indicando assim quanto o alimento havia absorvido.

1.17.2 Inoculação da suspensão de esporos no meio sólido

Após a hidratação do meio sólido as seguintes quantidades de meio sólido foram adicionadas em erlenmeyers de 250 mL (TABELA 1):

TABELA 1 - MEIOS SÓLIDOS SELECIONADOS PARA A INOCULAÇÃO DOS ESPOROS

Erlenmeyer (substrato)	Alimento (g)	Água (mL)
Arroz cateto	10	11
Arroz branco	10	10
Amendoim	5	8
Farinha de trigo integral	5	10
Milho	10	10

Inoculou-se 1 mL da mesma suspensão de esporos de *A. parasiticus* em cada frasco erlenmeyer e incubou-se na estufa a 28°C durante 5 dias.

1.18 Extração das micotoxinas

Em beakers de 100 mL pesou-se dois gramas de cada cultivo, adicionou-se 10 mL de clorofórmio sendo deixados sob agitação por 5 minutos. As amostras foram filtradas por papel filtro e então adicionou-se novamente 10 mL de clorofórmio, agitou-se durante 5 minutos e filtrou-se novamente. O filtrado foi levado ao banho-maria fervente até completa evaporação da fase clorofórmica, obtendo-se o extrato com as micotoxinas.

1.18.1 Purificação

Para a purificação dos extratos diluiu-se os mesmos em 10 mL de metanol e verteu-se para um funil de separação. Adicionou-se 5 mL de cloreto de sódio 4% e 5 mL de hexano. Agitou-se a mistura por 5 minutos e o hexano foi descartado. Adicionou-se 10 mL de clorofórmio, agitou-se e, posteriormente, o clorofórmio foi lavado com 2 porções de água. Filtrou-se o clorofórmio em papel filtro com sulfato de sódio anidro e posteriormente evaporou-se o clorofórmio em banho maria fervente, obtendo-se o extrato purificado.

1.19 Análise das aflatoxinas extraídas do meio de cultura

Após a extração e purificação, primeiramente, analisou-se os extratos por CCD para verificar a presença de aflatoxinas nos meios sólidos, utilizou-se como fase móvel clorofórmio:acetona (9:1; v/v) e tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (6:3:1; v/v), utilizando uma placa de sílica gel G com indicador de fluorescência (10cm x 10cm), segundo metodologia descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1989) e Gimeno (1979). Posteriormente os extratos foram analisados por CLAE em equipamento Varian Prostar, utilizando-se as condições descritas na TABELA 2 (BARBAS, 2005).

TABELA 2 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA CLAE

Coluna	Microsorb-MV C18 4,6mm x 250mm x 5µm
Fase móvel	água:metanol:acetonitrila 5:4:1 (v:v)
Fluxo	0,8 mL/min
Temperatura	21°C
Detector	Fluorescência $\lambda_{ex}=365\text{nm}$ e $\lambda_{em}= 455\text{nm}$
Volume de injeção	10µL

1.19.1 Curva padrão CLAE

Para a realização da curva padrão foi adquirido um padrão da Sigma constituído de uma solução de metanol com as quatro aflatoxinas lote: LC02599 validade: outubro de 2016. Para analisar o padrão e realizar uma curva padrão, utilizou-se as mesmas condições estabelecidas para a análise dos meios sólidos com diferentes volumes de injeções conforme a TABELA 3.

TABELA 3 – CONCENTRAÇÕES TESTADAS DAS AFLATOXINAS PARA A CURVA PADRÃO

Injeção (µL)	Concentração G1 e B1 (µL/mL)	Concentração G2 e B2 (µL/mL)
5	0,005	0,0015
10	0,01	0,003
15	0,015	0,0045
20	0,02	0,006
25	0,025	0,0075
50	0,05	0,015

1.20 Análise da influência do pH e da umidade do meio na produção de aflatoxina

Preparou-se frascos erlenmeyers de 250 mL com o substrato (arroz cateto) em diferentes pH e umidades conforme a TABELA 4. Posteriormente 1 mL da solução de esporos foi inoculada e incubou-se os meios à 28°C durante 5 dias.

TABELA 4 - VARIAÇÃO DE UMIDADE E pH DO MEIO DE CULTIVO SÓLIDO

Meios	pH	Umidade (%)
1	3,5	42
2	3,5	52
3	3,5	62
4	5,5	42
5	5,5	52
6	5,5	62
7	7,5	42
8	7,5	52
9	7,5	62

Verificou-se o pH dos meios após o tempo de incubação e então realizou-se a extração das micotoxinas com 10 mL de clorofórmio (2x) e realizou-se a purificação conforme já descrito no item 3.6.1, e posteriormente analisou-se por CCD e CLAE.

1.21 Curva de produção de aflatoxinas

Foram preparados 30 frascos erlenmeyers de 250 mL com 10g de arroz cateto e umidade de 52%. Este valor de umidade foi selecionado de acordo com o teste de absorção de água, para que não existisse a presença de água livre no cultivo. Inoculou-se cada meio com 1mL de suspensão de esporos e incubou-se na estufa à 28°C. Durante 10 dias retirou-se 3 erlenmeyers da estufa por dia, e extraiu-se as micotoxinas com clorofórmio conforme item 3.5. Após todas as amostras serem retiradas, foi quantificado em CLAE a aflatoxina.

1.22 Isolamento e purificação de aflatoxina B2

Para isolar e purificar AFB2 utilizou-se o extrato da curva de produção com maior quantidade de AF e aplicou-se em uma placa de sílica gel G com indicador de fluorescência (10cm x 10cm) e realizou-se a corrida preparativa com a fase móvel clorofórmio: acetona (9:1; v/v).

Após o tempo de corrida, a fração contendo apenas as aflatoxinas B1 e B2 foi removida e então se extraiu as aflatoxinas com 5mL de metanol (2x). Levou-se os extratos à centrifuga a 3500rpm durante 3 minutos e evaporou-se o sobrenadante a 100°C. Posteriormente a evaporação completa, adicionou-se 1mL de acetonitrila e realizou-se 15 aplicações em uma placa de sílica gel G com indicador de fluorescência (10cm x 10cm), com a fase móvel toluento:acetato de etila:ácido fórmico:clorofórmio (70:50:50:20; v/v).

Após a corrida, isolou-se a fração da AFB2 e recuperou-se a aflatoxina com 5mL de metanol (2x). Levou-se o extrato a centrifuga a 3500rpm durante 3 minutos e posteriormente evaporou-se o sobrenadante, obtendo-se a AFB2 isolada.

1.23 Derivatização das aflatoxinas com ácido trifluoracético (TFA)

Para a derivatização das aflatoxinas foi utilizado um extrato da curva de produção, o qual foi evaporado em banho-maria fervente e então diluído em 600 µL de metanol. Após ser diluído, preparou-se em microtubos tipo eppendorf, soluções contendo 100 µL do extrato e diferentes volumes de TFA (10µL, 20µL, 30µL e 40µL) e agitou-se por 3 minutos. Posteriormente, aplicou-se o extrato sem TFA e o extrato derivatizados com as diferentes concentrações de TFA em uma placa de sílica gel G com indicador de fluorescência (10cm x 10cm) e utilizou-se a fase móvel toluento:acetato de etila:ácido fórmico:clorofórmio (70:50:50:20; v/v) e analisou-se a placa sob luz ultravioleta (MACHINSKI JUNIOR, 2008).

1.24 Análise de aflatoxina presente em alimentos

1.24.1 Extração da aflatoxina

Para as aflatoxinas em amostras sólidas (grãos e cereais) submeteu-se as amostras à extração sólido-líquido. Adicionou-se 15mL de clorofórmio em 20g da amostra e agitou-se durante 5 minutos, filtrou-se o clorofórmio em papel filtro e repetiu-se o procedimento. Realizou-se a purificação conforme item 3.6.1.

1.24.2 Identificação e quantificação da aflatoxina por CLAE

Realizou-se a CLAE com coluna em fase reversa (C18) em um equipamento com detector de fluorescência, utilizando-se uma fase móvel, em modo isocrático, constituída de água:metanol:acetonitrila (50:40:10; v:v), conforme TABELA 2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.25 Morfologia do *A. parasiticus*

Com o microcultivo entre lâmina e lamínula foi possível observar a morfologia do fungo, percebeu-se o crescimento dos conídios em projeções de espinhos e forma esférica, principal diferença entre o *A. parasiticus* e *A. flavus*, o qual apresenta conídios com forma esférica a elípticas. As paredes finas e lisas também caracterizam o *A. parasiticus*, enquanto o *A. flavus* possui conídios com paredes de leve a moderadamente rugosas, conforme mostra as FIGURA 7.

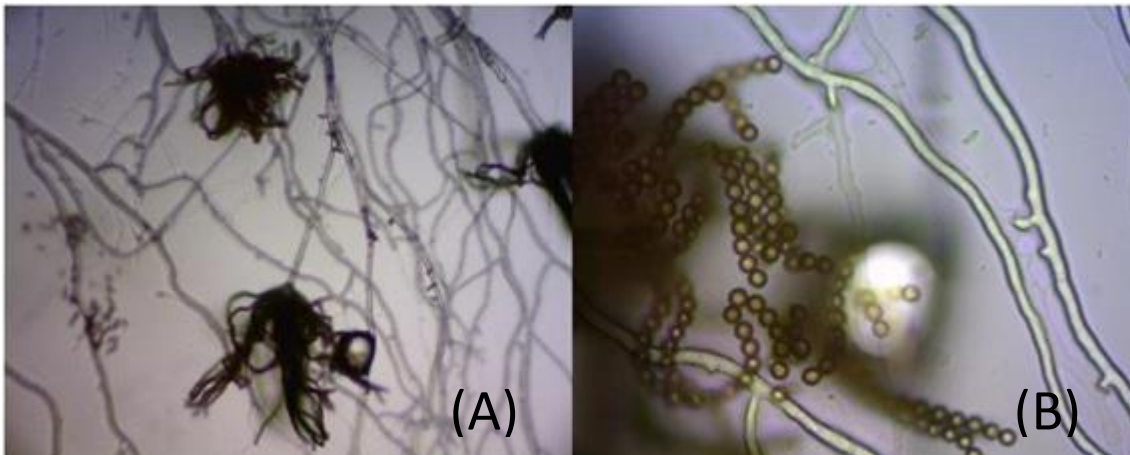


FIGURA 7 - CRESCIMENTO DE *Aspergillus parasiticus* ENTRE LÂMINA E LAMÍNULA. EM (A) AUMENTO DE 40x E EM (B) AUMENTO DE 100x

1.26 Seleção do meio de cultura para a produção de aflatoxinas

1.26.1 Teste de absorção

No teste de absorção de água foram adicionados 100 mL de água em 10g de cada alimento e pode-se observar que, conforme TABELA 5, a farinha de trigo integral foi o substrato com maior absorção de água e com este resultado ao

preparar os meios sólidos para a fermentação, no meio com farinha de trigo integral utilizou-se o maior valor de umidade (66,7%). Para o arroz branco, milho e arroz cateto utilizou-se valores de umidade de 50%, 50% e 52% respectivamente por apresentaram volumes próximos de água absorvida. Para o meio de amendoim, optou-se por uma umidade de 53,3% devido a ter apresentado um volume de absorção intermediário, que não é alto como a absorção da água pela farinha de trigo, mas é maior que a absorção dos outros substratos.

TABELA 5 - ABSORÇÃO DE ÁGUA DOS SUBSTRATOS

Substrato	Água absorvida (mL)	pH
Arroz cateto	9	6,62
Arroz branco	8	7,17
Amendoim	15	6,02
Farinha de trigo integral	21	6,05
Milho	10	6,37

1.26.2 Produção de aflatoxinas em diferentes substratos

1.26.2.1 Cultivo do *A. parasiticus* em diferentes substratos

Conforme Kumar, Basu e Rajendran (2008) constataram a contaminação por micotoxinas em produtos agrícolas é um fato regularmente encontrado, principalmente em grãos e sementes. Dessa forma, ao testarmos os substratos amendoim, milho, farinha de trigo integral, arroz cateto e arroz branco para a fermentação em estado sólido, já esperávamos o crescimento do *A. parasiticus* e a produção de aflatoxinas pelo mesmo em todos os alimentos. E o resultado encontrado apresentou-se de acordo com as expectativas. Houve crescimento e esporulação nos 5 substratos testados (FIGURA 8).

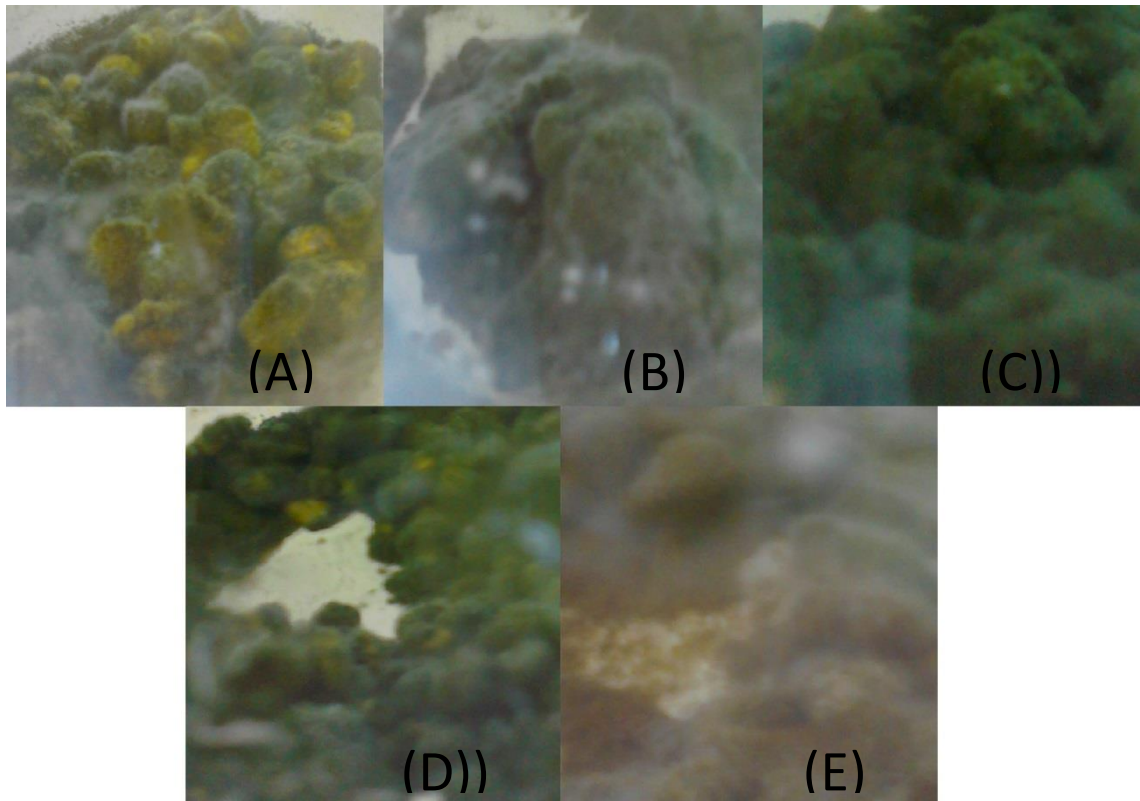


FIGURA 8 - CULTIVO DE *A. parasiticus* EM: (A) MILHO, (B) FARINHA DE TRIGO INTEGRAL, (C) ARROZ BRANCO, (D) ARROZ CATETO, (E) AMENDOIM

1.26.2.2 Análise da produção de aflatoxinas nos diferentes substratos

1.26.2.2.1 Cromatografia em camada delgada

Para analisar a produção de aflatoxinas nos diferentes substratos, o extratos foram aplicados em placas de sílica para a realização da CCD e ao visualizar a placa sob a luz ultravioleta (FIGURA 9) percebeu-se que houve produção das 4 aflatoxinas em todos os substratos conforme era esperado, uma vez que a cepa NRRL2999 produz as quatro aflatoxinas durante o processo de fermentação, porém nos substratos arroz cateto, arroz branco e farinha de trigo integral ocorreu melhor produção das quatro aflatoxinas enquanto nos substratos amendoim e milho ocorreu melhor produção de AFB1 e AFG1.

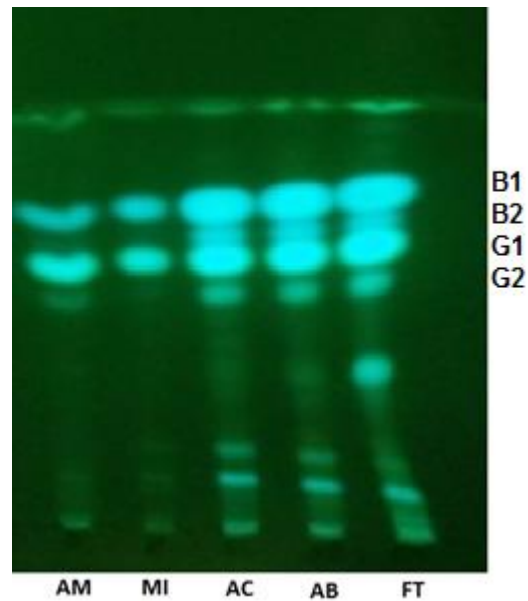


FIGURA 9 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DOS MEIOS SÓLIDOS (AM – AMENDOIM; MI – MILHO; AC – ARROZ CATETO; AB – ARROZ BRANCO E FT – FARINHA DE TRIGO INTEGRAL)

1.26.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Após verificar por CCD que existiu a produção de AF em todos os substratos testados, analisou-se a produção de aflatoxinas por CLAE. Confirmou-se a presença das 4 principais aflatoxinas em todos os substratos em estudo porém em diferentes concentrações. Para o cultivo nos diferentes substratos foi utilizada a mesma temperatura, o mesmo tempo de incubação e a mesma suspensão de esporos, porém a produção foi diferente devido a disponibilidade de carboidrato que cada alimento apresentou para o fungo.

Os picos das aflatoxinas presentes no cromatograma do arroz branco (FIGURA 12) apresentaram alta intensidade, porém verificou-se a presença de picos indesejáveis provenientes da matriz próximos a AFG2. Devido a estes picos o arroz branco também não foi o substrato de escolha para a fermentação em estado sólido.

Os cromatogramas do arroz cateto (FIGURA 13) e da farinha de trigo integral (FIGURA 14) apresentaram picos para as aflatoxinas com alta intensidade como os do arroz branco, porém com menos picos indesejáveis próximos aos picos

das aflatoxinas. Desta forma os dois substratos foram considerados os melhores para a continuação do estudo. O arroz cateto foi o substrato selecionado para os próximos ensaios, pois alguns experimentos necessitam do uso de peneiras e a farinha de trigo integral poderia apresentar dificuldade de trabalho devido ao tamanho das partículas.

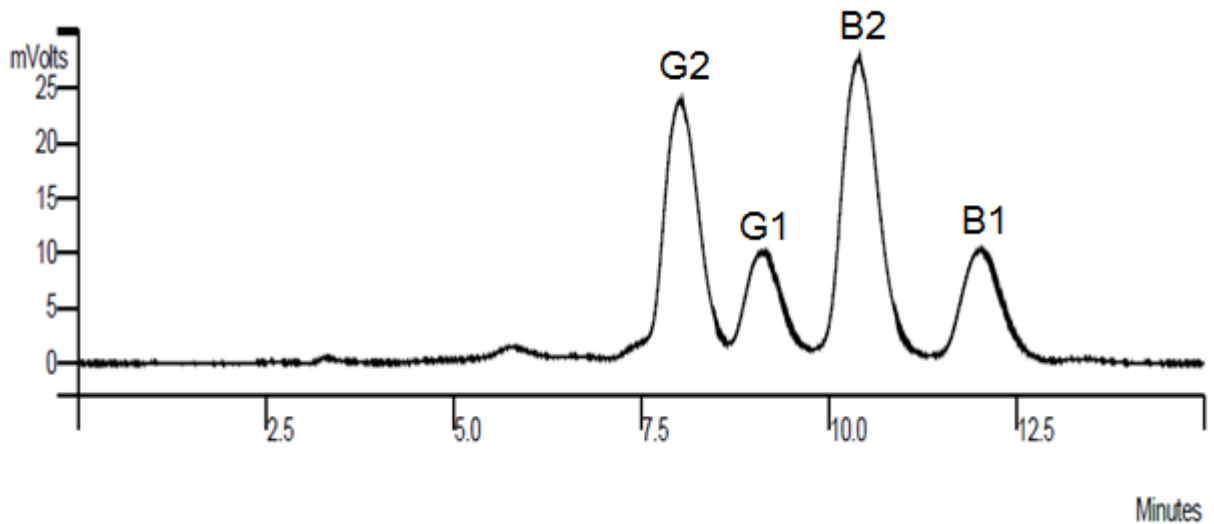


FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO CULTIVO DE *A. parasiticus* EM MEIO SÓLIDO AMENDOIM

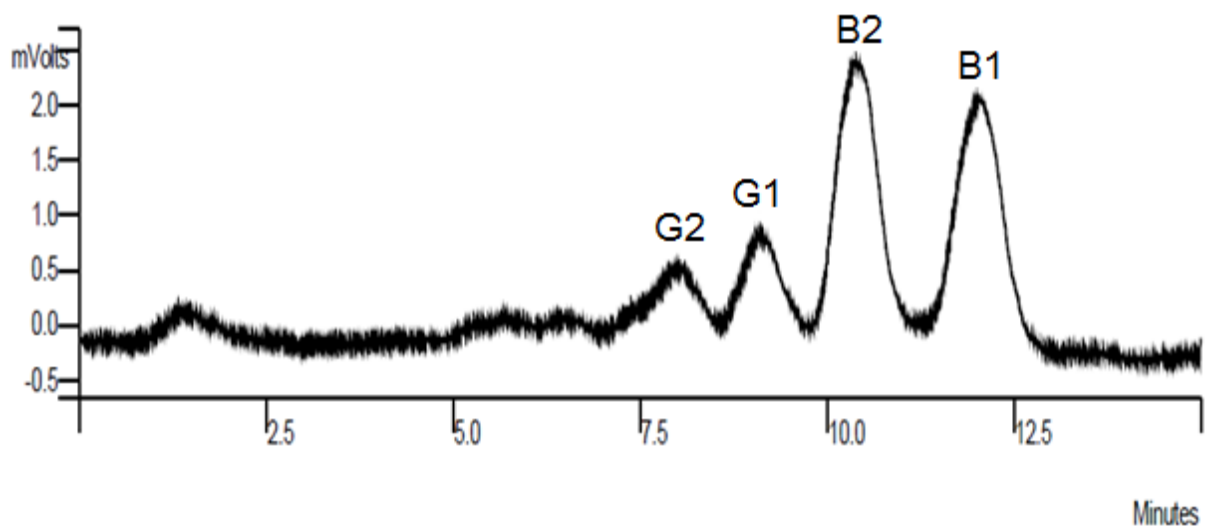


FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO CULTIVO DE *A. parasiticus* EM MEIO SÓLIDO MILHO

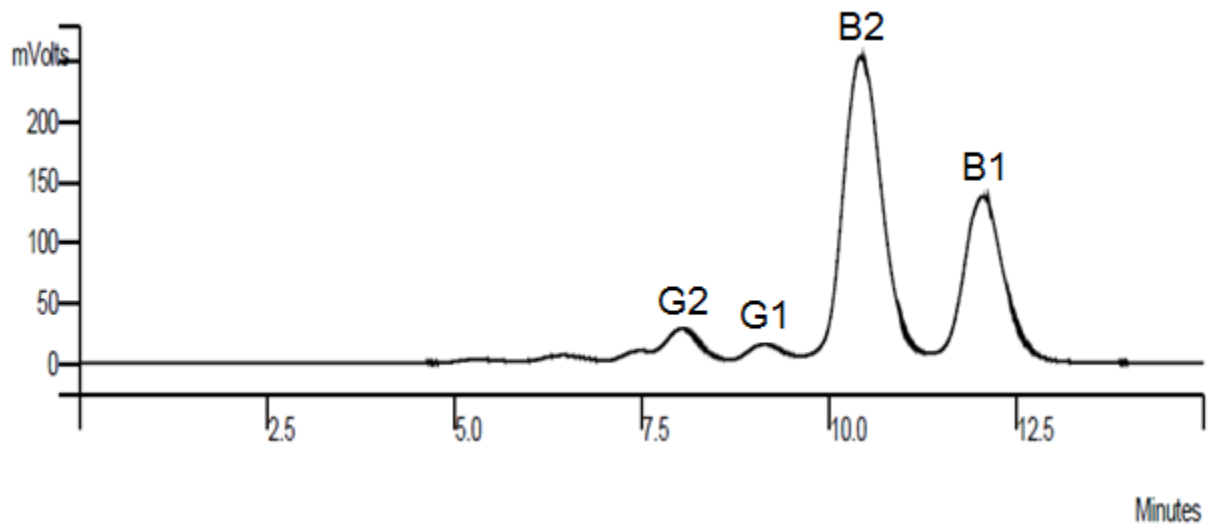


FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO CULTIVO DE *A. parasiticus* EM MEIO SÓLIDO ARROZ BRANCO

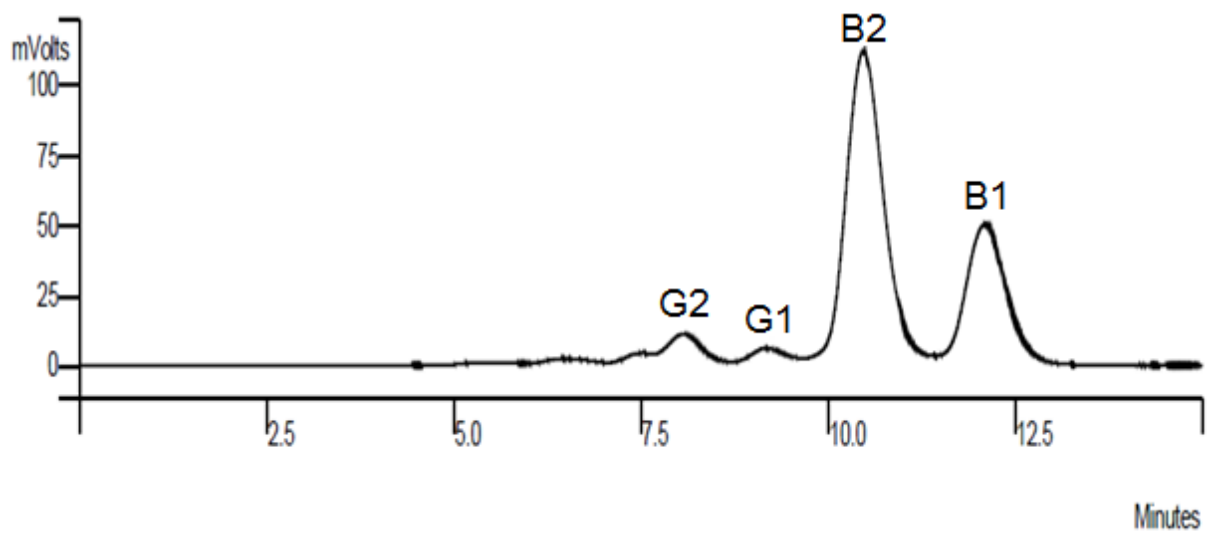


FIGURA 13 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO CULTIVO DE *A. parasiticus* EM MEIO SÓLIDO ARROZ CATETO

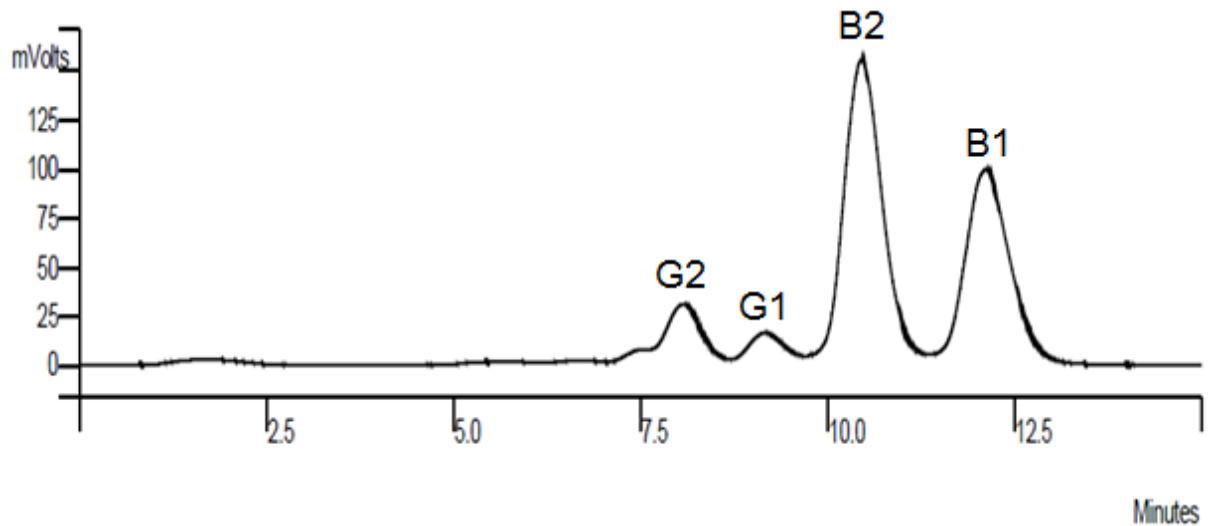


FIGURA 14 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO CULTIVO DE *A. parasiticus* EM MEIO SÓLIDO FARINHA DE TRIGO INTEGRAL

1.27 Curva padrão de AFB2 por CLAE

Para a realização da curva padrão injetou-se diferentes volumes da solução padrão no CLAE, tendo um perfil de corrida visto na FIGURA 15. A curva padrão foi construída em termos de AFB2. Optou-se por utilizar a AFB2 entre as quatro aflatoxinas em estudo por apresentar uma melhor resposta ao detector de fluorescência (FIGURA 16).

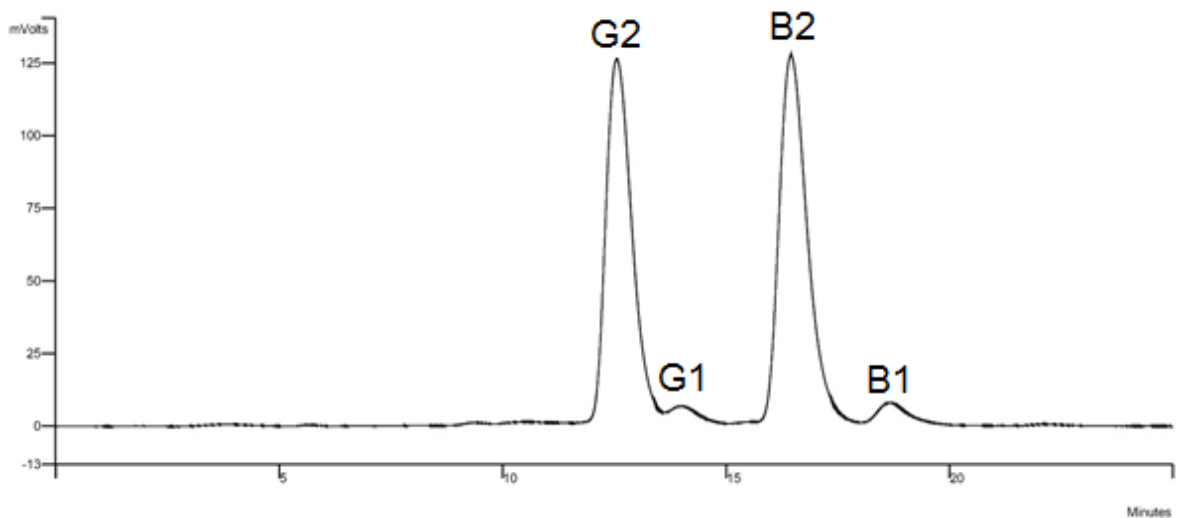


FIGURA 15 - CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS A INJEÇÃO DO PADRÃO DE 20 μ L DO PADRÃO CONTENDO AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2

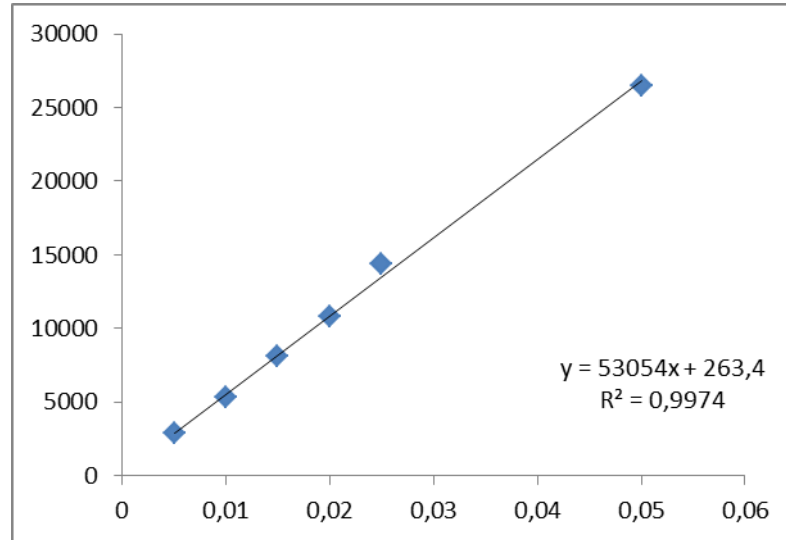


FIGURA 16 - CURVA PADRÃO DE AFB2 POR CLAE

Para analisar se a correlação é significativa entre as variáveis x e y , utiliza-se o coeficiente de correlação (r^2). Quando o valor de r^2 é igual a 1, existe uma relação linear perfeita (SINKO, 2008). O r^2 calculado para a curva padrão foi de 0,9974, e por ser um valor próximo a 1, a curva apresenta uma relação confiável entre as variáveis.

1.28 Análise da influência do pH e umidade do meio

Para analisar a influência do pH e umidade sobre a produção de AF, realizou-se a fermentação em estado sólido utilizando meios com diferentes valores de umidade entre 42% e 52% e diferentes valores de pH entre 3,5 e 7,5 e posteriormente analisou-se os extratos por CCD e CLAE.

1.28.1 Análise da influência do pH e umidade do meio por CCD

Antes de analisar a produção de aflatoxinas nos meios com diferentes valores de pH e umidade, verificou-se o pH das amostras após o tempo de incubação. Foi possível perceber que para alcançar melhores condições de crescimento e metabolismo o fungo realizou tamponamento nos meios. Todos os

cultivos apresentaram valores para pH dos meios próximos a 5 com variação de $\pm 0,55$ (TABELA 6). Ao analisar as amostras por CCD constatou-se que houve produção de aflatoxinas independente do pH e da umidade. As bandas correspondentes a AFB2 e AFG1 apresentaram maior fluorescência que as bandas correspondentes a AFB1 e AFG2, indicando uma maior produção destas aflatoxinas (FIGURA 17).

TABELA 6 - VALORES DE pH DOS CULTIVOS PARA AS DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH E UMIDADE

Meio	pH inicial	pH final	Meio	pH inicial	pH final	Meio	pH inicial	pH final
1	3,5	5,86	4	5,5	5,54	7	6,5	5,61
2	3,5	5,23	5	5,5	5,34	8	6,5	5,45
3	3,5	4,88	6	5,5	5,40	9	6,5	5,61

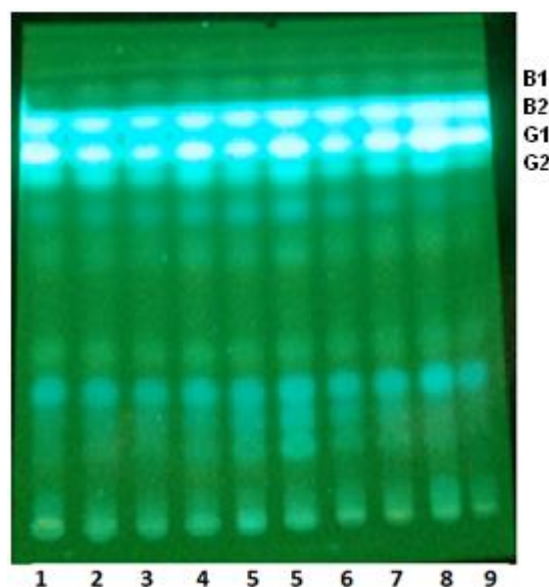


FIGURA 17 - CCD DOS EXTRATOS OBTIDOS DOS MEIOS COM DIFERENTES VALORES DE pH E UMIDADE. EM: 1 (pH 3,5 E UMIDADE 42%), 2 (pH 3,5 E UMIDADE 52%), 3 (pH 3,5 E UMIDADE 62%), 4 (pH 5,5 E UMIDADE 42%), 5 (pH 5,5 E UMIDADE 52%), 6 (pH 5,5 E UMIDADE 62%), 7 (pH 7,5 E UMIDADE 42%), 8 (pH 7,5 E UMIDADE 52%) E 9 (pH 7,5 E UMIDADE 62%)

1.28.2 Análise da influência do pH e umidade do meio por CLAE

Após verificar que o pH e a umidade não apresentam influência qualitativa sobre a produção de AF, quantificou-se a AFB₂ por CLAE e foi possível perceber que as amostras com os maiores valores de umidade que são as amostras 3, 6 e 9 apresentaram maior produção conforme a FIGURA 18. Choi e colaboradores (2015) também analisaram a influência da umidade sobre a produção de aflatoxinas em arroz por uma espécie de *Aspergillus* e verificaram que quando em maiores valores de umidade, a produção de AF foi maior. Estes dados relacionados à umidade são de grande importância para estabelecer condições de armazenamento e transporte mais seguros para a integridade e qualidade dos alimentos. Além do armazenamento e transporte, existe também a preocupação quanto às condições de cultivo. Após várias pesquisas constatou-se que as condições climáticas durante o cultivo apresentam influência sobre o crescimento fúngico e produção de micotoxinas (COLE, 1989). Janardhana, Raveesha e Shetty, em 1999, realizaram um estudo na Índia e constataram que amostras de milho de estações chuvosas apresentaram uma contaminação por aflatoxina de 47% enquanto amostras de estações de verão apresentaram 17%.

Ao analisar a influência do pH foi possível perceber que diferentemente da umidade, a variação do pH não apresentou uma alteração relevante na produção de AFB₂, conforme Mateles e Adye (1965) constataram em seus estudos Este dado é importante principalmente nas discussões existentes quanto às condições de armazenamento de alimentos, pois é possível perceber que se as condições de umidade não forem controladas durante o armazenamento, a probabilidade de contaminação e a quantidade de produção de aflatoxinas é maior quando o valor de umidade é alto.

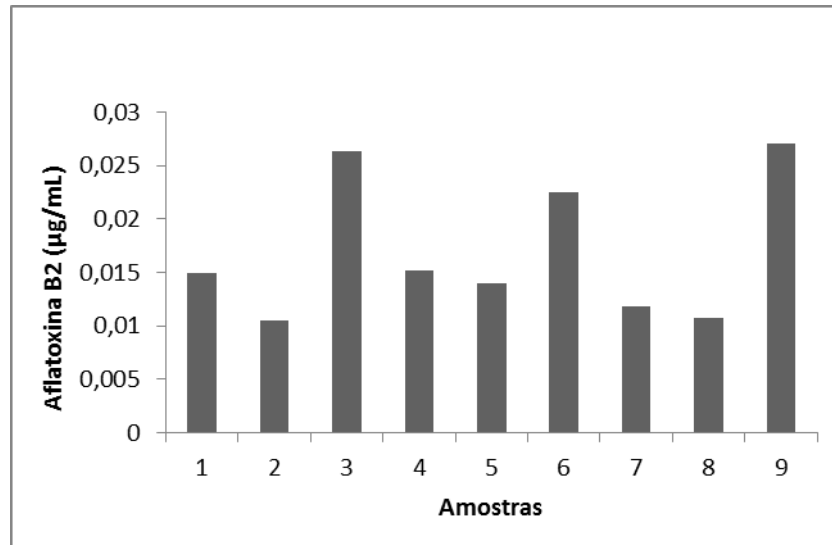


FIGURA 18 - AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO pH E UMIDADE NO MEIO. EM: 1 (pH 3,5 E UMIDADE 42%), 2 (pH 3,5 E UMIDADE 52%), 3 (pH 3,5 E UMIDADE 62%), 4 (pH 5,5 E UMIDADE 42%), 5 (pH 5,5 E UMIDADE 52%), 6 (pH 5,5 E UMIDADE 62%), 7 (pH 6,5 E UMIDADE 42%), 8 (pH 6,5 E UMIDADE 52%) E 9 (pH 7,5 E UMIDADE 62%)

1.29 Curva de produção de aflatoxina B2

Analisou-se a produção de aflatoxina pelo *Aspergillus parasiticus* em arroz cateto durante 10 dias a 28°C. De acordo com Taniwaki, Fonseca e Pizzirani-Kleiner (1993) a produção de aflatoxinas não é uniforme, o que pode ser observado na TABELA 7 e na FIGURA 19. Do primeiro dia ao sexto dia de estudo houve um aumento da concentração de AFB2 no meio dia pós dia, porém no sétimo e no oitavo dia esta concentração começou a diminuir para então voltar a aumentar após o nono dia. De acordo com Schroeder e Ashworth (1966), a produção de aflatoxinas está intimamente ligada ao ambiente, e esta produção resulta da interação entre o genótipo da linhagem fúngica e as condições ambientais em que ela está crescendo. Portanto, o comportamento de outra cepa de *Aspergillus parasiticus* poderia ser diferente quanto à produção de aflatoxinas.

TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO DE AFB2 DURANTE PERÍODO DE CRESCIMENTO DE 10 DIAS

Tempo (dias)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	0
2	0,89897
3	3,77993
4	5,50607
5	6,63645
6	8,68427
7	8,01968
8	2,79527
9	7,57415
10	17,27055

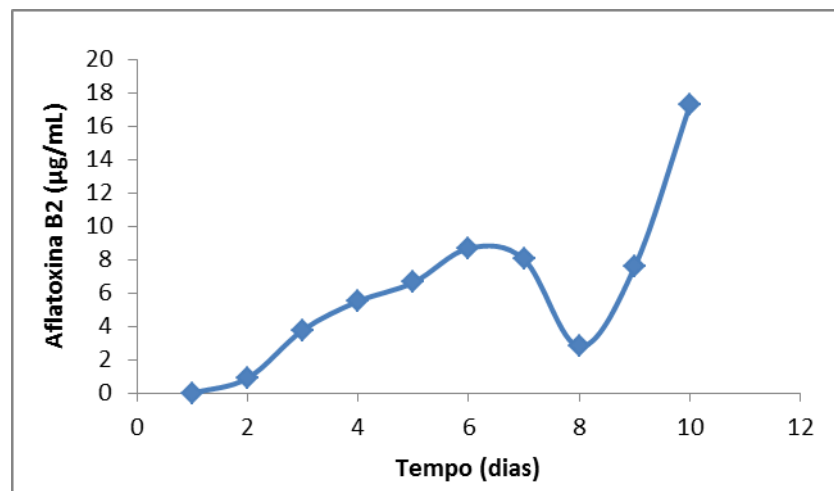


FIGURA 19 - CURVA DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINA B2

Esta não uniformidade na concentração de AFB2 no meio durante o período de estudo pode ter ocorrido devido ao fato de que as aflatoxinas são formadas a partir do mesmo precursor, o versiconal-hemiacetal-acetato, o que pode limitar a disponibilidade do precursor para a AFB2 uma vez que outra aflatoxina seja produzida em maior concentração que a B2. Outro possível motivo para esta não uniformidade é a existência da conversão entre AFB1 e AFB2, uma vez que a conversão de AFB2 para AFB1 possa explicar a diminuição da concentração de B2

no sétimo e oitavo dia, e a conversão de AFB1 para AFB2 possa explicar o aumento de AFB2 após o nono dia (BRASE *et al.*, 2013).

1.30 Purificação AFB2

Através da CCD preparativa, isolou-se a AFB2 das outras aflatoxinas. Posteriormente a purificação da AFB2, realizou-se uma corrida no CLAE e comparou-se o cromatograma da AFB2 purificada ao cromatograma do padrão (FIGURA 20).

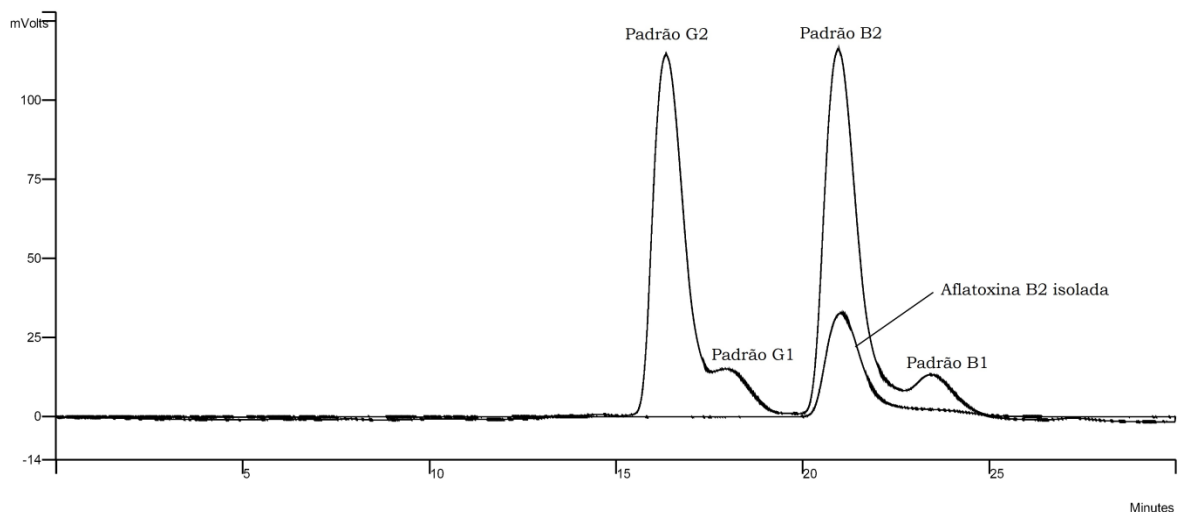


FIGURA 20 - CROMATOGRAMA AFB2 PURIFICADA E PADRÃO

1.31 Derivatização das aflatoxinas

Para a obtenção dos derivados AFB2a e AFG2a, adicionou-se à solução de aflatoxinas diferentes concentrações de TFA e então analisou-se as amostras por CCD e CLAE (FIGURA 21 e FIGURA 22).

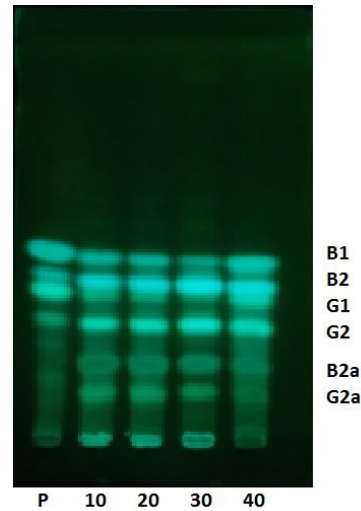


FIGURA 21 - CROMATOGRAMA DAS AFLATOXINAS B1, B2, G1 E G2 E DERIVADOS B2a E G2a (OS VALORES DE 10, 20, 30 e 40 REFEREM-SE AO VOLUME DE TFA QUE FOI ADICIONADO A 100 μ L DO EXTRATO DAS AFLATOXINAS)

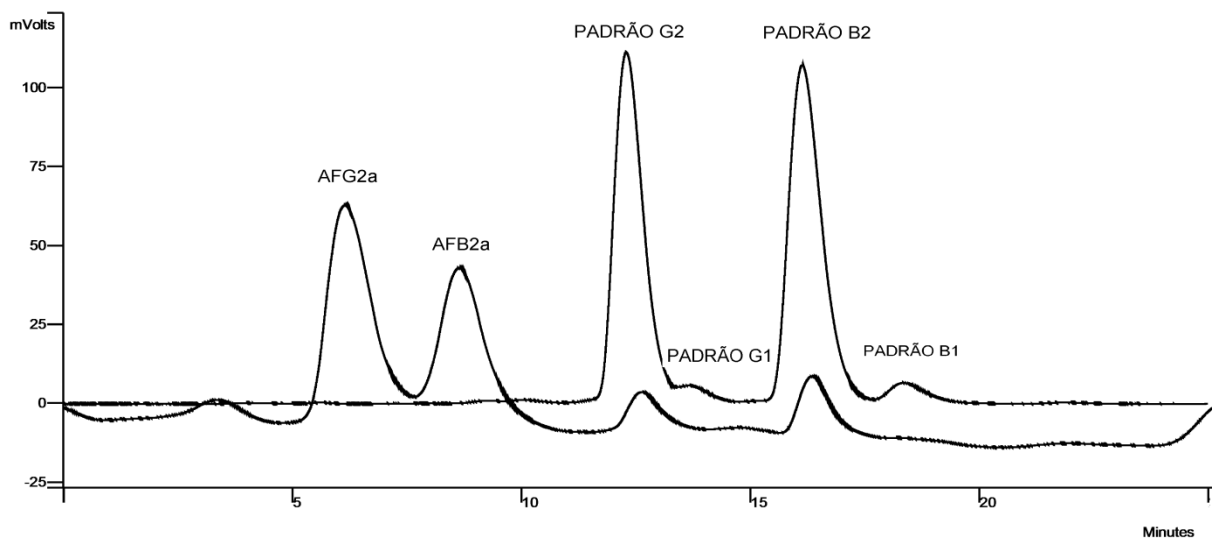


FIGURA 22 - CROMATOGRAMA PADRÃO E DERIVADOS AFB2a e AFG2a.

As concentrações de TFA variaram entre 10 μ L e 40 μ L, e todas as amostras com TFA sofreram derivatização, porém nenhuma apresentou a derivatização completa das AFB1 e AFG1 em seu derivados AFB2a e AFG2a, respectivamente. Para a identificação dos derivados, comparou-se os fatores de retenção (Rf) do cromatograma com os Rfs obtidos por Machinski Junior (2008), que foram valores muito próximos, apresentando uma pequena variação dos valores obtidos (TABELA 8). Segundo Takahashi (1977), principalmente quando utiliza-se CLAE acoplado a

um detector de fluorescência para a análise de AFB1 e AFG1, que apresentam pouca fluorescência, é importante este passo de hidroxilação, pois seus derivados AFB2a e AFG2a são altamente fluorescentes.

TABELA 8 - VALORES DE Rf DAS AFLATOXINAS E DERIVADOS COMPARADOS AO TRABALHO DE MACHINSKI JUNIOR (2008).

Aflatoxinas	Rf (artigo)	Rf após derivatização com TFA (artigo)	Rf obtido	Rf obtido após derivatização com TFA
B1	0,43	0,13	0,42	0,17
B2	0,36	0,33	0,38	0,35
G1	0,30	0,07	0,34	0,11
G2	0,24	0,21	0,28	0,26

1.32 Análise das aflatoxinas em alimentos

Entre os alimentos que foram utilizados como amostras para a análise da presença de aflatoxinas em alimentos estão: arroz, feijão, milho, farinha de trigo, farinha de fubá e amendoim. Os resultados estão descritos na TABELA 9.

TABELA 9 - ANÁLISE DOS ALIMENTOS PARA A PRESENÇA DE AFLATOXINAS

Alimentos	Amostras analisadas	Amostras contaminadas
Arroz	7	4
Feijão	6	1
Amendoim	3	1
Milho	5	0
Farinha de trigo	3	0
Farinho de fubá	3	0

Apesar de o feijão não ter sido testado como substrato sólido para a fermentação, ao pesquisar a presença de aflatoxinas em seis amostras, foi encontrado contaminação em uma amostra. Na etapa de seleção do melhor

substrato sólido para a fermentação, tanto o arroz branco quanto o arroz cateto ficaram entre os três meios com maior produção de aflatoxinas. Durante a pesquisa de contaminação de alimentos, o arroz foi o alimento com maior número de amostras contaminadas. Foram analisadas sete amostras de arroz e quatro estavam contaminadas, representando 57% de amostras com presença de aflatoxinas.

Ao realizar a pesquisa de aflatoxinas em milho e farinha de fubá, não foi encontrado nenhuma contaminação, o que já esperava-se uma vez que em condições adequadas para a o crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas, a concentração de AF foi baixa. A farinha de trigo, mesmo sendo um dos substratos que apresentaram maior concentração de AF na fermentação em estado sólido, quando utilizado como amostra na pesquisa destas micotoxinas em alimentos, nenhuma amostra apresentou contaminação. Apesar de na fermentação em estado sólido o amendoim ter apresentado baixas concentrações de AF, das três amostras pesquisadas uma apresentou contaminação. Foram analisadas 27 amostras de alimentos e 22% apresentaram-se contaminadas. Esses alimentos contaminados apresentam alto risco à saúde da população de ingere esses alimentos, uma vez que as aflatoxinas apresentam um alto potencial carcinogênico. Todos os alimentos contaminados por aflatoxinas não apresentaram uma concentração dentro dos limites de quantificação apresentados pela curva padrão utilizada neste trabalho.

CONCLUSÃO

Ao analisar diferentes substratos, valores de umidade e pH para a fermentação em estado sólido, verificou-se a produção de aflatoxinas em todas as diferentes condições testadas, porém observou-se maior produção de AF em arroz cateto e farinha de trigo. Percebeu-se também que em valores de umidade mais elevados a produção de AF foi maior enquanto a variação de pH não apresentou influência, mesmo quando em condições não adequadas para a produção. Os substratos escolhidos para meio sólido para o crescimento de *A. parasiticus* foram os mais citados em literatura e onde pode ocorrer a produção de aflatoxinas, desta maneira foi observado que todos os substratos mostraram-se adequados ao crescimento fúngico nas condições de umidade, pH e temperatura estudados.

Ao realizar a pesquisa de AF em alimentos, verificou-se contaminação em 4 amostras de arroz, 1 amostra de feijão e 1 amostra de amendoim. As amostras contaminadas não apresentaram uma concentração de AF dentro dos limites de quantificação apresentados pela curva padrão utilizada no presente trabalho, porém pode-se afirmar que as amostras estão em conformidade com a legislação vigente que estabelece um limite de 20 μ g/kg para aflatoxinas totais em amendoim e milho, e 5 μ g/kg para arroz, feijão, trigo e fubá.

O presente trabalho demonstrou que o crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas podem ocorrer nestes alimentos desde que estes grãos ou alimentos apresentem umidade suficiente para o desenvolvimento do fungo. Desta maneira as boas condições de produção, armazenamento e processamento destes alimentos é uma maneira simples para minimizar o aparecimento destas espécies fúngicas e, conseqüentemente, a produção de aflatoxinas, evitando assim a contaminação.

REFERÊNCIAS

ARMORINI, S.; ALTAFINI, A.; ZAGHINI, A.; RONCADA, P. Occurrence of aflatoxin B1 in conventional and organic flour in Italy and the role of sampling. **Food Control**. Vurrey, v.50, p.858-863, 2015.

ASIM, M.; SARMA, M. P.; THAYUMANAVAN, L.; KAR, P. Role of Aflatoxin B1 as risk for primary liver cancer in north Indian population. **Clin. Biochem.** Toronto, v.44, n.14-15, p.1235-1240, 2011.

BARBAS, C.; DAMS, A.; MAJORS, R. E. Separation of Aflatoxins by HPLC. **Agilent Technologies**. Estados Unidos, 2005. Disponível em: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-3634EN.pdf>

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochem.** London, v.47, n.2, p.175-185, 2012.

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochem.** London, v.38, n.6, p.881-896, 2003.

BILANDZIC, N.; BOZIC, D.; DJOKIC, M.; SEDAK, M.; KOLANOVIC, B. S.; VARENINA, I.; CVETNIC, Z. Assessment of aflatoxin M1 contamination in the milk of four dairy species in Croatia. **Food Control**. Vurrey, v.43, p.18-21, 2014.

BINDER, E. M.; TAN, L. M.; CHIN, L. J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Anim. Feed Sci. and Technol.** Amsterdam, v.137, n.3-4, p.265-282, 2007.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Anim. Feed Sci. and Technol.** Amsterdam, v.173, n.1-2, p.134-158, 2012.

BRASIL. Resolução n. 34/76 da Comissão Nacional de Normas e padrões para alimentos. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. Ministério da Saúde. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 1977.

BRASIL. Portaria n. 183, art1do Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Adotar regulamento técnico do MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela resolução n. 56/94 do grupo Mercado comum do Sul de 1 de janeiro de 1995. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 1996.

BRASIL. Resolução RDC n. 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002. Ministério da Saúde. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 2002.

BRASIL. Resolução RDC n. 7, da ANVISA, de 18 de fevereiro de 2011. Ministério da Saúde. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 2011.

BULLERMAN, L. B. Mycotoxins-Classification. **Encyclopedia of Food Microbiology**. Oxford: Elsevier, p.1512-1520, 1999.

BURGER, H. M.; SHEPHARD, G. S.; LOUNW, W.; RHEEDER, J. P.; GELDERBLOM, W. C. A. The mycotoxin distribution in maize milling fractions under experimental conditions. **Int. J. Food Microbiol**, Amsterdam, v.165, p.57-64, 2013.

CHAN, K.; HSIEH, D. P. H.; LUNG, M. L. In vitro aflatoxin B1-induced p53 mutations. **Cancer Lett.** Virginia, v.199, n.1, p.1-7, 2003.

CHELI, F.; PINOTTI, L.; ROSSI, L.; DELL'ORTO. Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: A review. **Food Sci. and Technol.** London, v.54, n.2, p.307-314, 2013.

CHOI, S.; JUN, H.; BANG, J.; CHUNG, S.; KIM, Y.; KIM, B.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. Behaviour of *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum* on rice as affected by degree of milling, temperature, and relative humidity during storage. **Food Microbiol.** London, v.46, p.307-313, 2015.

COLE, R. J. Preharvest aflatoxin in peanuts. **Int. Biodeterior.** Birmingham, v. 25, n.4, p.253-257, 1989.

CORCUERA, L. A. VETTORAZZI, A.; ARBILLAGA, L.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LÓPES DE CERAIN, A. An approach to the toxicity and toxicokinetics of aflatoxin B1 and ochratoxin A after simultaneous oral administration to fasted F344 rats. **Food Chem. Toxicol.** Oxford, v.50, n.10, p. 3440-3446, 2012.

DEMIR, H.; TARI, C. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. **Ind. Crop. Prod.** v.54, p. 302-309, 2014.

D`MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. Anim. **Feed Sci. Technol.** Amsterdam, v.69, n.1-3, p.155-166, 1997.

DOMINJAN, A. M.; PERAIXA, M.; ZLENDES, V.; CVJETKOVIC, B.; JURIEVIC, Z.; TOPOLOVEC-PINTARIC, S.; IVIC, D. Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. **Food and Chem. Toxicol.** v.43, n.3, p.427-432, 2005.

ELSANHOTY, R. M.; RAMADAN, M. F.; EL-GOHERY, S. S.; ABOL-ELA, M. F.; AZEKE, M. A. Ability of selected microorganisms for removing aflatoxins in vitro and fate of aflatoxins in contaminated wheat during baladi bread baking. **Food Control.** Vurrey, v.33, n.1, p.287-292, 2013.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003: Mycotoxin regulations in 2003 and current developments, 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e07.htm#bm07/>

FDA – Food and Drug Administration. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Aflatoxins, 2013. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm071020.htm>

GALATI, S.; GIANNUZZI, L.; GINER, S. A. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of *Aspergillus parasiticus* on irradiated Argentinian flint maize. **J. Stored Prod. Res.** Elmsford, v.47, n.1, p.1-7, 2011.

GARCIA, D.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Predicting mycotoxins in foods: A review. **Food Microbiol.** London, v.26, n.8, p.757-769, 2009.

GIESEKER, K. E.; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), "Outbreak of Aflatoxin Poisoning - Eastern and Central Provinces, Kenya, January - July 2004". **Public Health Faculty Publications.** v.53, n.43, p.789-793, 2004.

GIMENO, A. Thin-layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** Washington, v.62, n.3, p.579-585, 1979.

GIRAY B.; GIRGIN, G.; ENGIN, A. B.; AYDIN, S.; SAHIN, G. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. **Food Control.** Vurrey, v.18, n.1, p.23-29, 2007.

GOUAS, D.; SHI, H.; HAINAUT, P. The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): Biomarker of exposure, early detection and target for therapy. **Cancer Lett.** Virginia, v.286, n.1, p.29-37, 2009.

GUENGERICH, F. P.; JOHNSON, W. W.; SHIMADA, T.; UENG, Y.; YAMAZAKI, H.; LANGOUET, S. Activation and detoxication of aflatoxin B1. **Mut. Res.** Amsterdam, v. 402, n.1-2, p.121-128, 1998.

HABIB, S. L.; SAID, B.; AWAD, A. T.; MOSTAFA, M. H.; SHANK, R. C. Novel adenine adducts, N7-guanine-AFB1 adducts, and p53 mutations in patients with schistosomiasis and aflatoxin exposure. **Cancer Detec. Prev. Dekker**, v.30, n.6, p.491-498, 2006.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? **Ecology and industrial microbiology**. Kirschallee, v.8, n.3, p.301-306, 2005.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans e animals. **Toxicology**. Amsterdam, v.167, n.2, p.101-134, 2001.

JANARDHANA, G. R.; RAVEESHA, K. A.; SHETTY, H. S. Mycotoxin Contamination of Maize Grains Grown in Karnataka (India). **Food Chem. Toxicol.** Oxford, v.37, n.8, p. 863-868, 1999.

KAMDEM, L.K.; MEINEKE, I.; GODTEL-ARMBRUTS, U.; BROCKMOLLER, J.; WOJNOWSKI, L. Dominant contribution of P450 3A4 to the hepatic carcinogenic activation of aflatoxin B1. **Chem. Res. Toxicol.** Washington, v.19, n.4, p.577-586, 2006.

KEW, M. C. Aflatoxins as a Cause of Hepatocellular Carcinoma. **J. Gastrointest. Liver Dis.** Cluj-Napoca, v.22, n.3, p.305-310, 2013.

KRNJAJA, V.; MANDIC, V.; LEVIC, J.; STANKOVIC, S.; PETROVIC, T.; VASIC, T.; OBRADOVIC, A. Influence of N-fertilization on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. **Crop Protection**. v.57, p. 251-256, 2015.

KUMAR, V.; BASU, M. S.; RAJENDRAN, T. P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially importante agricultural commodities. **Crop Protection**. v.27, n.6, p.891-905, 2008.

LAI, X.; ZHANG, E.; LUI, R.; CHENGLAN, L. Potential for aflatoxin B1 and B2 production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples. **Saudi Journal of Biological Sciences**. p.1-5, 2014.

LEWIS L.; ONSONGO M.; NJAPAU H.; SHURZ-ROGERS H.; LUBER G.; KIESZAK S.; NYAMONGO J.; BACKER L.; DAHIYE, A. M.; MISORE, A.; DECOCK, K.; RUBIN, C. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. **Environ. Health Perspec.** v.113, p. 1763–1767, 2005.

LIU, Y.; CHANG, C. H.; MARSH, G. M.; WU, F. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: Systematic review and meta-analysis. **Eur. J. Cancer.** Oxford, v.48, n.14, p. 2125-2136, 2012.

MACHINSKI JUNIOR, M. Aflatoxinas: Análise em Amendoim por Cromatografia em Camada Delgada. In: Regina Lúcia de Moraes Moreau; Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2008, p. 194-199.

MATELES, R. I.; ADYE, J. C. Production of Aflatoxins in Submerged Culture. **Appl. Microbiol.** Washington, v.13, n.2, p.208-211, 1965.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Bioch. Eng. J.** Amsterdam, v.13, n.2-3, p.81-84, 2003.

QIAN, G.; TANG, L.; WANG, F.; GUO, X.; MASSEY, M. E.; WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; SHENG, J. Physiologically based toxicokinetics of serum aflatoxin B1-lysine adduct in F344 rats. **Toxicology.** Amsterdam, v.303, p.147-151, 2013.

RIBA, A.; BOURAS, N.; MOKRANE, S.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. **Food Chem. Toxicol.** Oxford, v.48, n.10, p.2772-2777, 2010.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview. **Int. J. Food Microbiol.** Amsterdam, v.119, n.1-2, p.3-10, 2007.

RODRIGUES, P.; VENANCIO, A.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. **Int. J. Food Microbiol.** Amsterdam, v.129, n.2, p.187-193, 2009.

RÓIGE, M. B.; ARANGUREN, S. M.; RICCIO, M. B.; PEREYRA, S.; SORACI, A. L.; TAPIA, M. O. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. **Rev. Iberoam. Micol.** Barcelona, v. 26, n.4, p. 233-237, 2009.

RUBIO, R.; BERRUGA, M. I.; ROMÁN, M.; MOLINA, A. Evaluation of immunoenzymatic methods for the detection of aflatoxin M1 in ewe's milk. **Food Control.** Vurrey, v.20, n.11, p. 1049-1052, 2009.

SAMSON, R. A.; HONG, S.; FRISVAD, J. C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Med. Mycol.** Oxford, v.44, p.133-148, 2006.

SCHROEDER, H. W.; ASHWORTH, L. J. Aflatoxins: Some factors affecting production and location of toxins in *Aspergillus flavus-oryzae*. **J. Stored Prod. Res.** Elmsford, p. 267-271, 1966.

SILVA, J. L.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, J. P.; COSTA, J. L. S.; RIBEIRO, K. O.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N. Ocorrência de aflatoxinas em feijões comercializados no mercado varejista de Goiânia-GO. **Pesquisa Agropecuária Tropical.** v.32, n.2, p.109-114, 2002.

SILVA, J. O.; CANDIDO, L. M. B.; NOVELLO, D.; MACHADO, C. Ocorrência de aflatoxinas em arroz consumido por militares do exercito brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciênc. Agrotec.** Lavras, v.32, n.4, p.1238-1244, 2008.

SINKO, P. J. **Martin: Físico-química e ciências farmacêuticas.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J. Amsterdam.** v.44, n.1, p.13-18, 2009.

SOARES, L.M.V., RODRIGUEZ- AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**. Arlington, v.72, n.1, p.22-26, 1989.

STEYN, P. S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. **Toxicol. Lett.** Amsterdam, v.82-83, p.843-851, 1995.

TABATA, S. Mycotoxins: Aflatoxins and Related Compounds. In: FUQUAY, J. W. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2. ed. United Kingdom: Editora Elsevier, p.801-811, 2011.

TAKANASHI, D. M. Reversed-phase High-performance Liquid Chromatographic Analytical System for Aflatoxins in Wines with Fluorescence Detection. **J. Chromatogr.** Amsterdam, v. 131, p.147-156, 1977.

TANIWAKI, M. H.; FONSECA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. VARIABILIDADE DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS POR LINHAGENS DE *Aspergillus flavus* EM DIFERENTES TEMPOS DE MANUTENÇÃO. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v.50, n.1, p.140-150, 1993.

TIRADO, M.C.; CLARKE, R.; JAYKUS, L. A.; McQUATTERS-GOLLOP, A.; FRANK, J. M. Climate change and food safety: A review. **Food Res. Int.** Essex, v.43, n.7, p.1745-1765, 2010.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Anal. Chim. Acta**. Amsterdam, v.632, n.2, p.168-180, 2009.

VILLEGAS, E. et al. Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. **Biotechnol. Adv.** New York, v.11, n.3, p.387-397, 1993.

WHO – World Health Organization. Basic Food Safety for Health Workers, 1999. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/health-workers/en/>

WU, F.; NARROD, C.; TIONGCO, M.; LIU, Y. The health economics of aflatoxin: global burden of disease. *Aflacontrol*. Working paper 4, 2011. Disponível em: http://www.ifpri.org/sites/default/files/publications/aflacontrol_wp04.pdf

WILLIAMS, J.H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. J. Clin. Nutr.* New York, v. 80, p.1106 – 1122, 2004.

YANG, M.; ZHOU, H.; KONG, R. Y. C.; FONG, W. F.; QIANG-REN, L.; LIAO, X.; WANG, Y. ZHUANG, W.; YANG, S. Mutations at codon 249 of p53 gene in human hepatocellular carcinomas from Tongan, **China. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.*** v.381, n.1, p.25-29, 1997.

YU, J.; WOLOSHUK, C. P.; BHATNAGAR, P.; CLEVELAND, T. E. Cloning and characterization of *avfA* and *omtB* genes involved in aflatoxin biosynthesis in three *Aspergillus* species. ***Gene***. Amsterdam, v.248, n.1-2, p.157-167, 2000.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. ***J. Saudi Chem. Soc.*** v.15, n.2, p.129-144, 2011.

ZHENG, N.; SUN, P.; WANG; J. Q.; ZHEN, Y. P.; HAN, R. W.; XU, X. M. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and pasteurized milk in China Market. ***Food Control***. Vurrey, v.29, n.1, p.198-201, 2013.