

FUNGOS E MICOTOXINAS

Fungos: Características Gerais

Os fungos são organismos eucarióticos uni ou pluricelulares complexos e heterogêneos que não possuem clorofila ou outro pigmento fotossensibilizante, não apresentam celulose em sua parede celular e não armazenam amido como substância de reserva, condições essenciais aos organismos que constituem o Reino Vegetal. Por outro lado, assemelham-se às células animais por serem capazes de armazenar glicogênio e apresentarem substâncias quitinosas na parede celular. Diferenciam-se dos demais seres vivos por apresentar estrutura somática representada por hifas cujo conjunto constitui o denominado micélio. Tais hifas podem ser septadas e não septadas (cenocíticas). As colônias dos fungos filamentosos (bolors) podem apresentar aspectos algodinosos, aveludados, pulverulento e com variados tipos de pigmentação. Por sua vez, as colônias leveduriformes são, em geral, pastosas ou cremosas.

As estruturas de reprodução dos fungos chamadas esporos (propágulos), em condições ambientais favoráveis são capazes de se reproduzir e gerar novas células. Os esporos, de acordo com sua origem, podem ser sexuados ou assexuados. Os esporos assexuados são produzidos por processo de mitose e divisão celular, sendo geneticamente idênticos ao seu progenitor. Na reprodução sexuada, os esporos são gerados por uma alternância entre o estágio diplóide (no qual cada núcleo contém dois conjuntos de cromossomos) e o estágio haplóide (cada núcleo contém um conjunto de cromossomos). Um dos eventos característicos da reprodução sexuada é a fusão de dois núcleos haplóides para formar um núcleo diplóide. Isto requer a presença de núcleo haplóide sexualmente compatível. Nos fungos que produzem somente um tipo de núcleo, a reprodução ocorre somente quando o fungo entra em contato com outra cepa geneticamente diferente. Muitos fungos podem apresentar ambos os tipos de reprodução (sexuada e assexuada).

Os fungos encontram-se amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, e sobre animais e vegetais vivos. Alguns fungos crescem em um relacionamento simbiótico com algas fotossintéticas ou cianobactérias na forma de líquens. O vento funciona como

principal veículo de dispersão de esporos, esclerócios, clamidósporos e micélio. Quando encontram um substrato adequado e condições ambientais favoráveis eles germinam, multiplicam-se e colonizam, caso contrário, podem permanecer em latência por longos períodos sem a perda da viabilidade. O micélio exerce a função de assimilar, nutrir e fixar, podendo diferenciar-se em estruturas de frutificação, que servem à sua propagação.

Os fungos produzem uma variedade de metabólitos, os quais podem ser divididos em duas categorias: 1- moléculas derivadas do metabolismo primário, de importância estrutural ao fungo; 2- moléculas derivadas do metabolismo secundário que, aparentemente, não possuem função especial para a vida ou crescimento do microrganismo. Neste grupo incluímos as quinonas, os pigmentos, os antibióticos e as toxinas. A biossíntese dos metabólitos depende do acúmulo dos precursores do metabolismo primário, tais como malonatos, acetatos, piruvatos e aminoácidos. Ela ocorre após a fase de crescimento do fungo produtor, por meio das vias metabólicas catalisadas por reações enzimáticas.

Nutrição e Crescimento

Os fungos são seres heterotróficos retirando os nutrientes do meio ambiente circundante. Através de digestão enzimática externa transformam as substâncias de maneira que possam ser absorvidas. Assim, a nutrição da maioria dos fungos ocorre por absorção. De maneira geral, para seu crescimento, necessitam de fontes de carbono e de nitrogênio. A glicose é a principal fonte de carbono, porém outros açúcares como sacarose e maltose e fontes mais complexas como amido e a celulose também podem ser utilizadas. Fontes de nitrogênio inorgânico (sais de amônia ou nitratos), orgânico (peptona) e sais minerais (sulfatos e fosfatos) são utilizadas por fungos, dentre estas, a peptona é a mais utilizada. Também são necessários, em menor quantidade, oligoelementos como ferro, zinco magnésio, manganês, cobre, molibdênio, sendo que alguns necessitam de determinados fatores de crescimento que não conseguem sintetizar, em especial vitaminas como tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, etc.

A atividade de água do substrato também desempenha papel importante no crescimento fúngico. É definida como a relação entre a pressão de vapor de

um determinado material (p) e a pressão de vapor da água pura (p_0), nas mesmas condições. $A_a = p/p_0$. Os valores da atividade de água oscilam entre 0 e 1. À medida que uma solução se concentra, a pressão de vapor e a atividade de água diminui, a partir do valor máximo 1, que é o valor encontrado na água pura. A atividade de água mínima para o crescimento da maioria dos fungos, principalmente os toxigênicos, é na faixa de 0,77; abaixo de 0,60 de atividade de água, os fungos em geral não se reproduzem.

A temperatura de crescimento abrange uma larga faixa, havendo espécies psicrófilas, mesófilas e termófilas. Os fungos contaminantes de alimentos são, em geral, mesófilos, apresentando temperatura ótima entre 20 e 30°C.

Quanto à concentração de íons hidrogênio, os fungos filamentosos crescem numa ampla faixa de pH (1,5 a 11), sendo que um pH em torno de 5,6 é considerado ótimo para o desenvolvimento. A pigmentação dos cultivos, muitas vezes, está relacionada com o pH do meio.

Tendo em vista que o crescimento fúngico raramente ocorre como cultura pura, alguns microrganismos podem influenciar o crescimento fúngico, devido à competição que se estabelece no substrato de cultivo. Tais interações podem ser classificadas como antagônicas (ativa ou passiva) ou sinérgicas. O antagonismo ativo ocorre quando há inibição por contato ou inibição do crescimento pela produção de antibióticos, ácidos, etc. No antagonismo passivo não há inibição de um microrganismo pelo outro, mas sim competição por espaço ou por nutrientes essenciais ao desenvolvimento. Constatando-se, então, vantagem para o microrganismo que estiver em maior quantidade, possuir maior taxa de crescimento ou demonstrar melhor aptidão para explorar o substrato. Nas interações sinérgicas há o favorecimento de um ou ambos os microrganismos que colonizam o mesmo substrato.

Micotoxinas: Definição

A palavra micotoxinas é derivada dos termos gregos *mikes*, que significa fungos, e *toxikon*, que significa veneno ou toxina. São considerados metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos (bolores), cuja ingestão, contato ou inalação, pode ocasionar doenças ou, eventualmente, a morte. São produzidas por fungos passíveis de contaminar alimentos de origem vegetal, tais como grãos e cereais, desde o cultivo, passando pela colheita, pelo transporte, até o armazenamento, desde que satisfeitas as condições ideais de umidade e de temperatura.

As micotoxicoses são caracterizadas por síndromes difusas, porém, com lesões em determinados órgãos, como fígado, rim, tecido epitelial e do sistema nervoso central, dependendo do tipo de toxina. Também é possível a ocorrência simultânea de duas ou mais micotoxinas, que podem levar à potenciação dos efeitos tóxicos sobre o organismo suscetível.

Micotoxicoses são distribuídos em três categorias: micotoxicoses aguda primária, que ocorre quando é consumida quantidades moderadas a altas de micotoxinas, causando uma situação clínica específica aguda ou crônica; micotoxicoses primária, que ocorrem com o consumo de quantidades baixa a moderada, causando diminuição da eficiência de reprodução, ganho de peso e taxa de crescimento; sinais clínicos que podem ser confundidos com outras patologias ou mesmo deficiência nutricional; micotoxicoses secundária, resultado da ingestão de baixos níveis de toxina, incapaz de causar micotoxicoses, porém, predispondo a doenças infecciosas, devido à imunossupressão.

Aspectos Históricos e Contemporâneos

Apesar da grande divulgação dos problemas relativos à higiene dos alimentos tais como resíduos de pesticidas, de fertilizantes, de aditivos e de conservantes, ainda é pouco conhecida a possibilidade da contaminação de matérias primas alimentares por fungos produtores de substâncias tóxicas (micotoxinas), produzidas por diversos gêneros fúngicos que fazem parte da microbiota ambiental e que podem causar intoxicações no homem e nos animais (micotoxicoses).

A partir de 1960, quando foram descritos episódios de intoxicação de aves na Inglaterra, evidenciou-se a importância das micotoxinas no estabelecimento de quadros patológicos desconhecidos até então. Em diversos criadouros avícolas daquele país verificou-se intensa mortalidade de marrecos, perus e faisões, elevando-se a mais de 100.000 o número de aves mortas, num período de 3 meses.

Após intensas investigações, verificou-se que as rações implicadas nos episódios estavam emboloradas e que as mesmas eram constituídas à base de amendoim, provenientes da África e do Brasil. Os extratos, obtidos das rações envolvidas com os surtos foram inoculados experimentalmente em marrecos jovens e reproduziram lesões hepáticas semelhantes à doença natural. Essas substâncias isoladas, que demonstraram ser extremamente tóxicas, foram apontadas como responsáveis pelo episódio e denominadas aflatoxinas (*Aspergillus flavus* toxin).

Com a evidenciação da descoberta das aflatoxinas e de seus efeitos tóxicos, abriu-se um capítulo novo na história da Ciência, o da moderna micotoxicologia.

Anteriormente a este episódio, existem na literatura científica relatos que são incluídos na atualidade como micotoxicose, graças aos estudos e conhecimentos decorrentes de milhares de trabalhos publicados em todo o mundo nestas quatro décadas. Historicamente, tem-se de início, o episódio denominado “Fogo de Santo Antonio” ocorrido na Idade Média, no território correspondente à França, quando milhares de pessoas foram intoxicadas pela ingestão de pão de centeio e de outros grãos contaminados com *Claviceps purpurea* e *Claviceps paspalii*. A sintomatologia apresentada manifestava-se por sensação de frio nas extremidades (mãos e pés), seguida de extremo calor, fenômenos hemorrágicos, convulsão e morte, conforme a dose ingerida. O episódio ganhou contornos miraculosos, pois os indivíduos intoxicados iam pedir a cura a Santo Antonio através de romarias organizadas ao túmulo deste santo. Devido ao afastamento dos locais onde produziam os pães contaminados, alguns indivíduos curavam-se naturalmente.

No século XX, surtos de ergotismo foram descritos na Rússia (1926), na Irlanda (1929), na França (1953) e na Etiópia (1978), sendo que neste último, mais de

140 pessoas foram afetadas por ergotismo gangrenoso relacionado ao consumo de aveia.

Em 1930, foram isoladas as substâncias responsáveis pelo envenenamento pelo ergot (grupo de alcalóides derivados do ácido D-lisérgico), como a ergotamina, a ergocriptina e a ergocristina. Estas podem estimular a musculatura lisa e causar vasoconstrição e contrações uterinas.

Na época que antecedeu a II Grande Guerra, e durante a mesma, episódios de intoxicações pela ingestão de cereais contaminados ocorreram em determinadas regiões da Rússia, quando populações famintas e soldados escavavam o gelo das regiões Siberianas à procura de alimentos. O gelo, funcionando como isolante térmico permitindo o desenvolvimento de fungos contaminantes (*Fusarium poae* e *F. sporotrichioides*), que utilizavam os restos de cereais enterrados como verdadeiros meios de cultura. Como consequência, produziam substâncias tóxicas (tricotecenos) sobre os alimentos que, quando consumidos, provocavam inflamação das mucosas (oral e gastrointestinal) e gastroenterite aguda. A moléstia evoluía com alterações do quadro sanguíneo, como diminuição do número de leucócitos, alterações da medula óssea e petéquias hemorrágicas na pele, culminando com síndromes hemorrágicas dos genitais. Paralelamente, foram observados distúrbios dos sistemas nervoso autônomo e central. Na dependência da resistência individual, condições gerais de nutrição e concentração de micotoxina ingerida, inúmeros óbitos foram assinalados. Vale ressaltar que os tricotecenos são também produzidos por outras espécies de fungos como *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* e *Stachybotrys*. Este grupo de substâncias apresenta alto grau de toxicidade e, por isso, é empregado na guerra química como produtor de hemorragias difusas e lesões disseminadas que levam o indivíduo rapidamente à morte. Recentemente, soube-se do uso de chuva amarela (*yellow rain*) por tricotecenos provenientes de fungos, no sudeste da Ásia.

Ecologia de Fungos Toxigênicos

Cerca de 100.000 espécies fúngicas já foram descritas, porém 300 destas espécies têm capacidade de produzir micotoxinas.

As principais espécies fúngicas produtoras de micotoxinas pertencem aos seguintes gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Phoma*, *Trichotecium*, *Cephalosporium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Pithomyces*, etc. Entretanto, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, os mais importantes do ponto de vista toxigênicos

Na medida em que todas as espécies são em geral ubiqüitárias, observa-se a presença de micotoxinas em todas as partes do mundo, embora algumas ocorram com maior frequência em determinados países, decorrentes de fatores climatológicos. No Brasil, as micotoxinas mais detectadas em alimentos são as aflatoxinas, as fumonisinas, ocratoxina A, zearalenona e deoxinivalenol.

Geograficamente, dentro do gênero *Aspergillus*, as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* são frequentemente isoladas em regiões tropicais e subtropicais, pouco frequentes em regiões de clima temperado e raramente isolados em regiões de clima frio. As espécies *A. ochraceus* e *P. verrucosum* são frequentes em regiões tropicais e temperadas, respectivamente.

Por sua vez, as espécies do gênero *Fusarium* destacam-se pela adaptação a diferentes condições ambientais. Assim sendo, a espécie *F. verticillioides* (= *F. moniliforme*), predomina em regiões tropicais e temperadas úmidas, mas é pouco frequente em zonas temperadas frias; *F. graminearum*, em regiões de clima tropical a temperado; *F. poae*, em clima temperado a frio e *F. sporotrichioides* em clima frio.

Os fungos que invadem os grãos podem ser divididos conforme suas necessidades de água, em dois grupos ecológicos: fungos de campo e de armazenamento. Os fungos de campo invadem os grãos antes da colheita, enquanto as plantas estão em crescimento no campo, ou depois de estarem cortadas em espigas, antes de serem debulhadas. Requerem altos teores de umidade nos grãos para se desenvolverem (20-21%) e pertencem aos gêneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Helminthosporium*. Os fungos de armazenamento, por sua vez, necessitam de teores de umidade mais baixos,

entre 13 e 18% e correspondem a várias espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*.

Alguns pesquisadores incluíram na classificação, um terceiro grupo, chamado de intermediário, que alberga espécies fúngicas que são encontradas no campo, durante o processo de cultivo da planta, na colheita e durante o armazenamento.

O desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas pelos mesmos, são dependentes de um complexo conjunto de fatores: 1- susceptibilidade do substrato à colonização do fungo produtor; 2- fatores físicos: temperatura, umidade do substrato, umidade relativa do ar, aeração, danos mecânicos e tempo de armazenamento; 3- fatores biológicos: capacidade genética do fungo em produzir micotoxinas, quantidade de esporos viáveis, interação de diferentes fungos presentes no mesmo substrato, interação de micotoxinas e presença de insetos. Entre esses fatores, o tipo de substrato, a umidade e a temperatura são os que exercem maior influência no crescimento fúngico e na produção de micotoxinas.

De modo geral, os produtos passíveis de veicular micotoxinas aos animais e ao homem são: produtos agrícolas como cereais e sementes oleaginosas, frutas vegetais, produtos de origem animal (como leite e seus derivados, carnes, embutidos e queijos curados por fungos), alimentos orientais fermentados e produtos fermentados tais como cervejas e vinhos, além das rações animais industrializadas.

O desenvolvimento de fungos em grãos armazenados é desencadeado em teores de umidade acima de 13,5%, sendo 0,77 a atividade de água mínima para o crescimento das principais espécies toxigênicas. Abaixo de 0,60 de atividade de água, em geral, os fungos não se reproduzem. Vale frisar que os valores de Aa para a produção de micotoxinas são, frequentemente, maiores do que aqueles necessários para o crescimento dos fungos produtores. Em temperaturas abaixo de 10 °C, a maioria dos fungos não se desenvolve e os que conseguem, o fazem lentamente. Considera-se como ideal para atingir-se o melhor crescimento aquela na faixa entre 25° e 30° C, embora algumas espécies do gênero *Aspergillus* se desenvolvam mais rapidamente em temperaturas acima dos 30 °C.

O conhecimento da microbiota presente em um alimento, bem como o grau de contaminação (UFC/g), é um dado importante na avaliação das condições de armazenamento do produto, na sinalização das micotoxinas presentes no substrato, e como referência para medidas governamentais no controle de micotoxinas. Entretanto, não substitui a determinação química da micotoxina, por métodos cromatográficos ou imunoensaios, essencial para o diagnóstico de uma micotoxicose.

Assim, a simples constatação de fungos toxigênicos em alimentos não significa, automaticamente, a presença de micotoxina no substrato; todavia indica que há, potencialmente, o risco de uma possível contaminação por micotoxinas. Se este alimento for, ainda, um bom substrato para produção de micotoxinas e se os fatores abióticos, principalmente umidade e temperatura, forem adequados, o risco dessa contaminação tende a aumentar.

Em relação às aflatoxinas, alguns autores mencionam que, em média, 50% das cepas de *Aspergillus flavus* são aflatoxigênicas. É importante ressaltar que a ausência de sinais visíveis de emboloramento não significa que o alimento se encontre livre de fungos e de toxinas.

As principais micotoxinas podem ser divididas em quatro grandes grupos: (1) Aflatoxinas, metabólitos biossintetizados principalmente por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*; (2) Ocratoxinas, produzidas principalmente por *A. ochraceus* e *Penicillium verrucosum*; (3) Fusariotoxinas, produzidas por espécies do gênero *Fusarium*, representadas por zearalenona, tricotecenos, moniliformina e fumonisinas.

AFLATOXINAS

As aflatoxinas são produzidas principalmente por cepas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* e *A. pseudotamarii*. O *Aspergillus flavus* destaca-se como importante produtor de aflatoxinas, sendo capaz de sintetizar as aflatoxinas B₁ e B₂, seguido pelo *A. parasiticus*, que é capaz de sintetizar as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. Quimicamente, as aflatoxinas possuem estrutura policíclica derivada de núcleo cumarínico, unido a sistema bifurânico e a pentona (aflatoxinas da série B) ou a lactona de seis membros (aflatoxinas da série G). São conhecidos 18 compostos distintos, entretanto, as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ são as mais frequentemente identificadas, e designadas de acordo

com a fluorescência emitida quando expostas à radiação ultravioleta (360 nm). A fluorescência azul (blue) é representada pelas aflatoxinas B₁ e B₂, e a fluorescência verde (green) pelas aflatoxinas G₁ e G₂.

AFB₁, considerada a mais tóxica, apresenta propriedades hepatotóxica, teratogênicas e mutagênicas podendo causar danos como hemorragias, edemas, imunossupressão e carcinoma hepático. Uma das causas da extrema toxicidade da AFB₁ é devido a sua rápida absorção pelo sistema gastrointestinal, fato que facilita a entrada da toxina na circulação sanguínea, através da via portal, e o seu transporte para o fígado, maior sítio de biotransformação da toxina (Figura 1). As reações que envolvem a conversão da AFB₁ para vários outros metabólitos, são mediadas, em grande escala, pelo citocromo P450, ligado à monooxigenases de função mista. Tal sistema encontra-se presente nos componentes da membrana do retículo endoplasmático dos hepatócitos e tem a função de facilitar a hidroxilação, a demetilação, a redução e a epoxidação, que ocorrem durante o processo de biotransformação. O metabolismo primário da AFB₁ pode ser visto como detoxificação não reversível, via formação de metabólitos hidroxilados (AFM₁, AFQ₁, AFP₁, AFB_{2a}), detoxificação reversível, via formação de aflatoxicol ou ativação da formação de aflatoxina 8,9-epóxido. Com exceção do aflatoxicol, que é catalizado por redutases citoplasmáticas, as outras são catalizadas por isoenzimas do complexo citocromo P450. A forma ativa da AFB₁ é um composto identificado como AFB₁-8,9-epóxido, que é uma molécula altamente eletrolítica e se liga covalentemente aos sítios nucleofílicos de macromoléculas (DNA, RNA e proteínas). Estas ligações formam os adutos, que no caso do DNA, é responsável pelos efeitos carcinogênicos e mutagênicos. A aflatoxina B₁ é classificada na classe 1 dos carcinógenos humanos pela International Agency for Research on Cancer (IARC).

As aflatoxinas apresentam baixo peso molecular, baixa solubilidade em água e alta solubilidade em solventes moderadamente polares, como clorofórmio, metanol e dimetilsulfóxido. São incolores, inodoras e não alteram o sabor dos alimentos. São estáveis a temperaturas elevadas, sendo destruídas por autoclavagem na presença de amônia e em tratamento com hipoclorito.

Umidade relativa do ar de 80-85%, atividade de água superior a 0,78, e temperatura de 33 °C são consideradas condições ideais para produção de aflatoxinas.

A exposição humana em relação às aflatoxinas pode ocorrer através da ingestão de alimentos diretamente contaminados, tais como amendoim, castanha-do-Brasil, milho, sementes de algodão, farelo de peixe e coco, ou de outros, como leite, produtos lácteos, carnes e ovos, originários de animais que consumiram ração contaminada.

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas com níveis máximos em alimentos previstos pela legislação. A concentração máxima estabelecida pela ANVISA em amendoim, pasta de amendoim, grãos de milho é de 20 µg/kg (ppb), somatória das aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂.

Para leite fluido e leite em pó, os limites de AFM₁ estabelecidos são, respectivamente, de 0,5 e 5 µg/L (ppb). Em alimentos para consumo animal (matérias primas e rações) o nível máximo permitido é de 50 µg/kg.

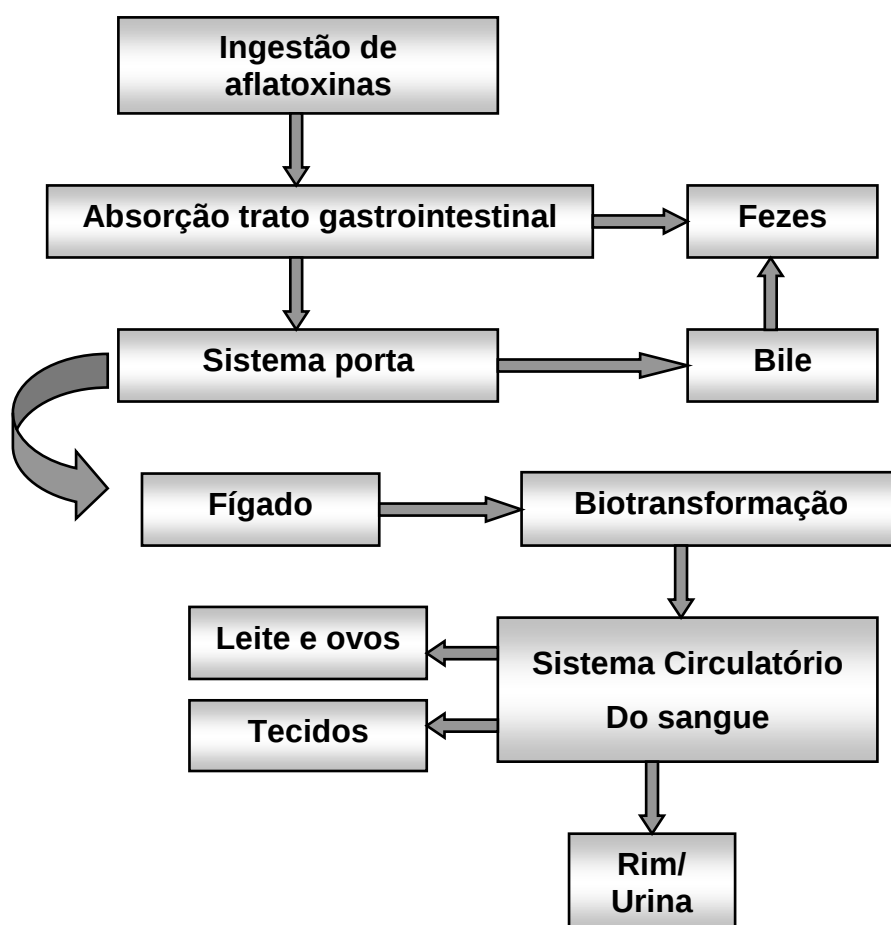


Figura 1 Biotransformação da aflatoxina

ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO

Ácido ciclopiazônico (ACP) foi primariamente isolado do *Penicillium cyclopium*, sendo os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* considerados produtores desta micotoxina. Dentre os fungos do gênero *Aspergillus*, o *A. flavus*, o *A. versicolor* e o *A. tamarii* são potencialmente produtores de ACP.

O ACP é inibidor específico da enzima Ca^{2+} ATPase e induz alterações no transporte de íons em membranas celulares. Clinicamente, quando os alimentos contaminados são consumidos, podem ocorrer degeneração e necrose hepática, lesões miocárdicas e neurotóxicas. No Brasil, 38% das cepas de *A. flavus* isoladas do amendoim foram produtoras de ACP.

A presença de ACP foi constatada em alguns alimentos como milho, amendoim, queijo, carnes, sementes de girassol, feno, tomate, queijo e leite. A toxicidade do ACP foi demonstrada em diferentes espécies animais, incluindo

ratos, frangos, cães e cobaias, sendo os principais órgãos atingidos o fígado, rins e sistema digestivo.

O papel do CPA na saúde humana ainda permanece obscuro, porém são fortes as evidências de sua participação no surto de intoxicação das aves ocorrido da Inglaterra, em 1960, devido à similaridade dos sinais clínicos descritos na ocasião com a intoxicação por ACP.

OCRATOXINAS

As ocratoxinas compreendem um grupo de substâncias derivadas de isocumarinas que possuem uma L-beta fenilalanina ligada a uma isocumarina. Embora uma série de ocratoxinas seja conhecida, somente a ocratoxina A (OTA) possui importância toxicológica. A OTA é uma micotoxina nefrotóxica, carcinogênica e imunotóxica produzida por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Dentro do gênero *Aspergillus*, a principal espécie produtora de OTA, principalmente em regiões tropicais é *A. ochraceus* (= *A. alutaceus*), porém a micotoxina pode ser produzida por *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. terreus*. A espécie *P. verrucosum* está associada principalmente ao armazenamento de cereais e é muito comum em países de clima temperado ou frio. A OTA pode ocorrer em diversos produtos, como milho, trigo, cacau, café, cevada, centeio, aveia, feijão, uva e rações para animais.

A OTA é uma substância cristalina, incolor à luz natural, mas que sob luz ultravioleta apresenta fluorescência azul-esverdeada. É pouco solúvel em água e apresenta solubilidade moderada em clorofórmio e metanol, fluorescendo nas cores verde e azul, quando em soluções ácidas e alcalinas, respectivamente.

A Aa mínima para o crescimento de *A. ochraceus* é 0,76 e para *P. verrucosum* 0,81. Para produção de OTA, a Aa mínima é de 0,83, para ambas as espécies. A temperatura ótima para o crescimento dos citados fungos é 25 °C .

O órgão alvo da tóxica é o rim, interferindo na síntese de macromoléculas, de células do parênquima renal, incluindo DNA, RNA e proteínas. Além disso, afeta o metabolismo dos hidratos de carbono renal, danificando o epitélio dos túbulos renais proximais, o que diminui a absorção de eletrólitos e aumenta a excreção de água através da diurese osmótica. Entre as espécies animais, os suínos apresentam alta sensibilidade a essa micotoxina, sendo uma das

micotoxinas mais tóxicas para essa espécie. A OTA também tem sido associada à etiologia da doença conhecida como Nefropatia Endêmica dos Bálcãs, uma desordem renal que afeta humanos moradores de áreas rurais dos Bálcãs, formada pelos países Bulgária, Romênia e Yugoslávia, e que pode lentamente levar a morte. Na Europa, análises de soro de indivíduos considerados saudáveis frequentemente contêm OTA, o que confirma a ampla e contínua exposição à toxina. OTA tem recebido considerável atenção desde 1993, quando a IARC a classificou como possível carcinógeno para o homem. Levantamentos realizados no Brasil demonstraram baixos níveis de contaminação por OTA

FUMONISINA

As fumonisinas são um grupo de micotoxinas estruturalmente relacionadas produzidas por espécies do gênero *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides* (= *F. moniliforme*) e *F. proliferatum*, fungos amplamente distribuídos na natureza e isolados frequentemente no milho e rações. Por se tratar de um dos principais fungos contaminantes do milho em todo o mundo, o *Fusarium verticillioides* tem sido constantemente associado a doenças nos indivíduos que utilizam este cereal como base da sua alimentação. Esta espécie se desenvolve em temperatura ótima de 22 a 28 °C e atividade de água acima de 0,87. (Tabela 3)

As fumonisinas despertaram o interesse da humanidade desde 1901, época em que surgiram os primeiros relatos com respeito ao “envenenamento por milho mofado”, relacionados à utilização do produto na alimentação de eqüídeos.

Até o presente momento, 18 diferentes fumonisinas (FB) foram descritas. Entretanto, as fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) são produzidas naturalmente. A FB₁ é a mais importante do grupo, constituindo, aproximadamente, 70% do total de fumonisinas. As concentrações de FB₂ e FB₃ são menores que a primeira, contribuindo com cerca de 15 a 30% das toxinas do grupo.

A fumonisina B₁ tem sido a principal causa da síndrome neurotóxica em equinos, a leucoencefalomalácia (LEME), edema pulmonar em suínos, câncer hepático em ratos, redução no desenvolvimento, problemas cardíacos,

imunossupressão, degeneração e necrose hepática em aves. Esta toxina, classificada no grupo 2B, segundo a IARC em 1993. Também já foi associada a casos de incidência de câncer de esôfago, em humanos, na África do Sul, na China, no nordeste da Itália e no sudeste dos Estados Unidos.

O principal sítio de ação das fumonisinas está relacionado ao metabolismo dos esfingolípídeos pela inibição das enzimas esfinganina e esfingosina n-acetil transferase, resultando no aumento intracelular da concentração de esfinganina livre ou, em menor grau, de esfingosina livre. Tal fato pode ser atribuído à similaridade das moléculas de fumonisinas com as de esfingosina e de esfinganina, responsáveis pela formação do complexo esfingolípídeos (esfingomielina e glicoesfingolípídeos). Detectados em altas concentrações no fígado e no cérebro, os esfingolípídeo são essenciais para o crescimento celular, diferenciação e transformação. Estas micotoxinas também são tóxicas para superfícies endoteliais, semelhantes àquelas detectadas nos pulmões e no cérebro.

Levantamentos realizados em diversas partes do mundo mostram que o milho usualmente está contaminado com fumonisinas, porém em níveis variáveis. No Brasil, estudos tem mostrado a presença desta toxina em milho em frequência acima de 90% e níveis médios abaixo de 3 µg/g. Em relação à produção de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides*, os estudos demonstram que 100% das cepas são produtoras de fumonisinas B₁ e B₂

Em termos mundiais não há regulamentação para os níveis de fumonisinas em alimentos, com exceção da Suíça, onde propõe um limite de tolerância de 1 µg/g para a somatória de FB₁ e FB₂. São recomendados níveis menores que 5 µg/g de FB₁ em ração para cavalos e outras espécies de eqüinos, 10 µg/g para a ração de suínos e 50 µg/g para o gado de corte e frango de corte.

TRICOTECENOS

Os tricotecenos, frequentemente referidos como micotoxinas imunossupressoras, são um grupo de aproximadamente 170 compostos tóxicos estruturalmente relacionados (tetracíclico 12, 13 –epoxitricotecenos), produzidos por fungos dos gêneros *Fusarium*, especialmente *F. graminearum*, *F. tricinctum*, *F. poae* e, também, dos gêneros *Myrothecium* e *Stachybotris* e

Cephalosporium. O crescimento dos citados fungos e a produção de tricotecenos são estimulados por condições climáticas oscilantes entre quente e fria. Para *F. poae* a temperatura ótima de crescimento varia de 22 a 28 °C e a Aa mínima necessária é 0,89 (Tabela 3). Baseados na sua estrutura química são divididos em dois grupos, denominados macrocíclicos e não macrocíclicos, sendo este último subdividido nos tipos A e B. Os tricotecenos de modo geral são cristais incolores, sendo os do tipo A moderadamente solúveis em solventes moderadamente polares, como clorofórmio, éter etílico, acetona. Por sua vez, os do tipo B dissolvem-se em solventes de alta polaridade tais como acetonitrila, ou metanol aquoso. São estáveis a 120°C, moderadamente estáveis a 180°C, porém, se decompõem a 210°C por 30 minutos. Entre os tricotecenos conhecidos, destacam-se a Toxina T2, o deoxinivalenol (DON) e o diacetoxiscirpenol (DAS), porém, o DON é o tricoteceno de maior ocorrência em alimentos e rações. Os sinais clínicos desta intoxicação são a recusa ou diminuição da ingestão de alimentos, vômitos, desordens digestivas e diminuição do ganho de peso. Inibidores potentes da síntese protéica, os tricotecenos bloqueiam os três maiores processos de tradução incluindo iniciação, alongamento e terminação da tradução. A alteração da síntese protéica afeta os sistemas gastrointestinal, hematopoiético, imunológico e nervoso. A sintomatologia observada está relacionada com a perda de peso, redução na conversão alimentar e produção de ovos, recusa de alimentos (anorexia), gastroenterite grave com vômito e diarreia sanguinolenta, dermatites, hemorragias, aborto e distúrbios nervosos. Os produtos com alto risco de contaminação por tricotecenos são milho, trigo, aveia, centeio, sorgo e rações, porém os levantamentos realizados no Brasil, mostram baixa ocorrência deste grupo de micotoxinas.

PATULINA

A patulina consiste de uma α , β lactona insaturada do grupo dos policetídeos que forma cristais incolores, tem ponto de fusão entre 105 e 108 °C, é solúvel em água, etanol, acetona, acetato de etila, éter e clorofórmio, mas é insolúvel em benzeno e éter de petróleo. Não é destruída por aquecimento e é estável em pH ácido. A toxina tem sido estudada desde 1941 por sua ação como antibiótico e, mais recentemente, por suas propriedades fitotóxicas e

carcinogênicas. Os níveis de Aa para o crescimento de *P. expansum* e, produção de patulina, é de 0,82 e 0,90, respectivamente.

Diversas espécies dos gêneros, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Byssopchlamys* são citadas como produtoras da toxina, porém *P. expansum* é considerada a mais importante. A toxina tem sido detectada em muitas frutas e sucos, vegetais, cereais e outros alimentos, entretanto, a maçã e seus derivados processados com frutos contaminados são as maiores fontes de contaminação. A ocorrência da toxina tem sido registrada em vários países de clima frio tais como Canadá, Estados Unidos, Alemanha e outros, porém, no Brasil são raros os trabalhos sobre o assunto.

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS E DE MICOTOXINAS

Os métodos convencionais utilizados na identificação de fungos de uma maneira geral tem sido baseados na morfologia macroscópica e microscópica, sendo que para esta última são utilizados exame direto e microcultivo. Entretanto, para o isolamento, a escolha do meio de cultura deverá ser realizada de maneira criteriosa, caso contrário poderá interferir nos resultados obtidos. Macroscopicamente devem ser observados a textura superficial da colônia, a topografia, a formação de pigmentos, tamanho da colônia, bordos, e relevo. Microscopicamente, ; Métodos convencionais para detecção e identificação de fungos toxigênicos em alimentos incluem cultivo do fungo e análise morfológica (macro e microscópica). Esta metodologia, baseada exclusivamente na morfologia dos fungos, requer maior disponibilidade de tempo e habilidade taxonômica. Dois são os métodos preconizados para o isolamento de fungos em alimentos e rações: 1- Diluição em placas, recomendado para alimentos em pó e líquidos; 2- Plaqueamento direto, para alimentos sólidos e grãos.

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi a primeira técnica cromatográfica para análise de micotoxinas e, atualmente, ainda é uma técnica bastante utilizada em análise rotineiras, principalmente de aflatoxinas em alimentos, pela rapidez na execução, reprodutibilidade, versatilidade e baixo custo.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), amplamente utilizada para detecção de micotoxinas em alimentos, apresenta vantagens em relação a

outros métodos analíticos. Quando combinada com sistemas de detecção por ultravioleta e fluorescência, tem mostrado boa reprodutibilidade.

A Cromatografia Líquida com Detector de Massa (LC-MS) também pode ser utilizada, porém o elevado custo do equipamento torna seu uso restrito.

Dentre os métodos que utilizam imunoensaios para detecção de micotoxinas, somente as técnica de Radioimunoensaio (RIA) e o Teste Imunoenzimático de Quantificação de Anticorpos (ELISA) tem sido adotados para esta finalidade. Esta última, a mais utilizada para análise de um grande número de amostras, destaca-se devido á facilidade e rapidez na execução.

A metodologia para detecção de micotoxinas compreende as seguintes etapas: amostragem, preparação da amostra, extração, purificação, detecção e quantificação, e confirmação da identidade da toxina.

A representação esquemática dos procedimentos analíticos para identificação de fungos e de micotoxinas encontra-se expressa na Figura 5

PREVENÇÃO E CONTROLE

O crescimento fúngico pode ser controlado pela secagem dos produtos a níveis seguros de umidade (atividade de água e teor de água). Entretanto, tal prática não oferece garantias quando as condições de armazenamento dos alimentos não forem adequadas havendo, com isso, o risco de se re-umedecerem. Como alternativa, existem métodos que utilizam substâncias químicas que inibem o desenvolvimento fúngico. Vários ácidos orgânicos, tais como ácido sórbico, ácido benzóico, ácido propiônico, ácido acético e ácido fórmico têm sido utilizados como preservativos, particularmente em produtos agrícolas estocados.

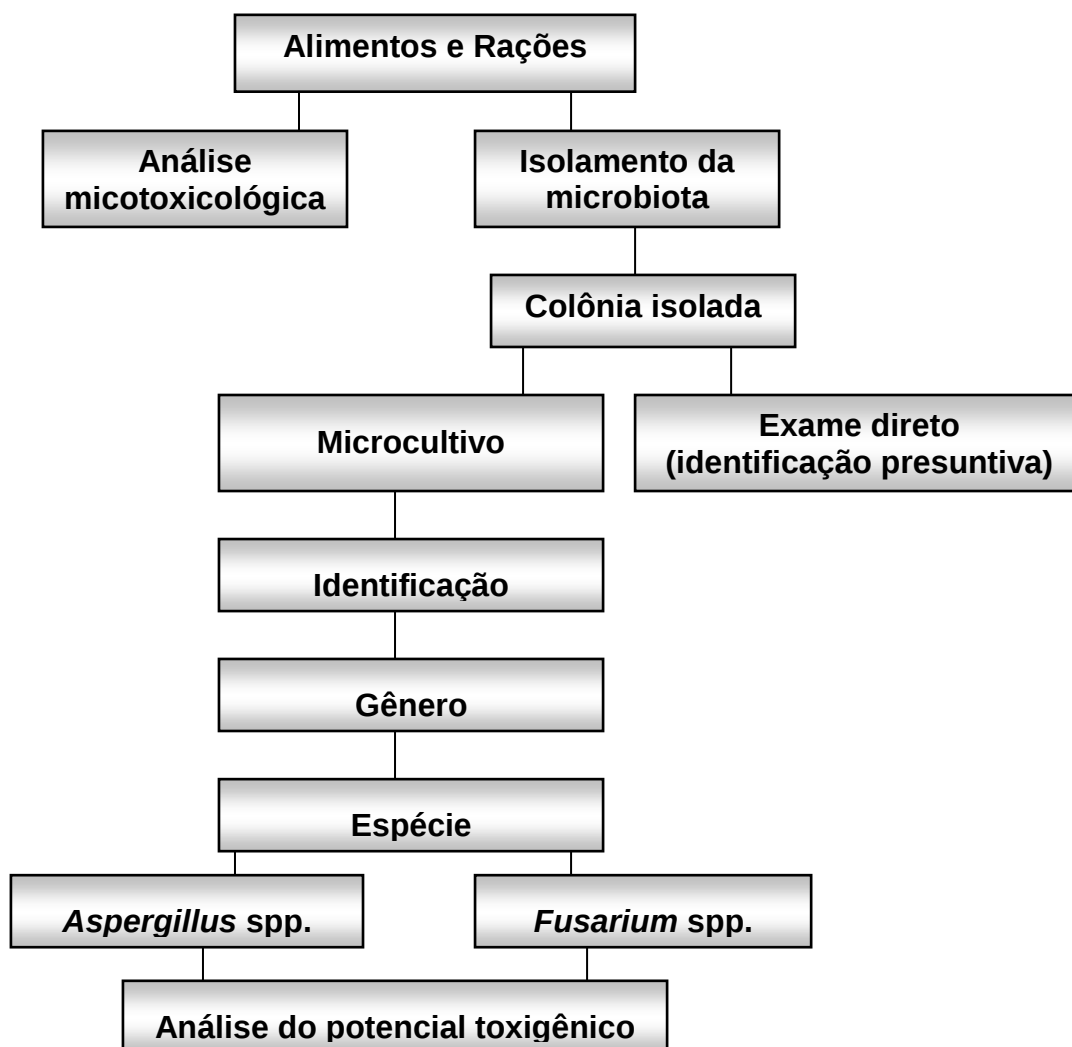
O emprego da radiação gama também tem se mostrado eficiente no controle de fungos e de micotoxinas em determinados alimentos sem, no entanto, provocar grandes alterações nas propriedades organolépticas e nutricionais dos alimentos. Melhoramentos genéticos também têm sido desenvolvidos com o objetivo de desenvolver variedades de sementes mais resistentes aos fungos toxigênicos ou que sejam capazes de inibir a produção de micotoxinas.

Na prática, as técnicas utilizadas na prevenção da contaminação, às vezes, são de difícil execução e de resultado incerto, pois são dependentes das condições climáticas e práticas realizadas por produtores e cerealistas. Assim

sendo, quando as medidas preventivas não forem eficientes devem-se utilizar técnicas de detoxificação. Tais técnicas, criadas e aplicadas principalmente para o controle das aflatoxinas, baseiam-se na utilização de propriedades físicas e químicas de solubilidade, sensibilidade à luz ultravioleta e de degradação química, transformando-as em produtos não tóxicos. Dentre as técnicas utilizadas na detoxificação de produtos, destacam-se a extração por solventes, as degradações química e biológica, a irradiação, o tratamento térmico, a remoção seletiva, e o emprego de adsorventes.

O controle das micotoxinas através de técnicas de detoxificação vem sendo efetuado, com relativo sucesso, em algumas partes do mundo, principalmente em relação às aflatoxinas. Entretanto, a prevenção por meio de boas de cultivo, de colheita, de secagem, de armazenamento e de transporte de grãos, podem contribuir para o retardamento do processo constituindo-se, ainda, a melhor maneira de se combater a problemática das micotoxinas e micotoxicoses.

Figura 2-Representação esquemática do procedimento analítico para determinação de micotoxinas, isolamento e identificação de fungos e pesquisa do potencial toxigênico das cepas isoladas.



Referências

Brasil. Ministério da Agricultura. Leis e Decretos. Portaria no. 183, de 21 de março de 1996. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 25 de mar. 1996. Seção 1.

Bullerman LB. Significance of mycotoxins to food safety and human health. *Journal Food Protection* 42: 65-86, 1979.

Chelkowski J. *Fusarium - Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. New York: Elsevier, 1989.

Christensen CM, Sauer DB. Mycoflora. In: Christensen CM (Ed.) *Storage of cereal and their products*. Minnesota, American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul: 219-240, 1982.

Coulombe RA. Aflatoxins. In: Sharma RP, Salunkhe DK. *Mycotoxins and Phytoalexins*. Boca Raton: CRC Press: 103-143, 1991.

Council for Agricultural Science and Technology (CAST) - *Mycotoxins: Risks in Plants, Animal, and Human Systems*. Task Force Report, n. 139, USA, 2003.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Worldwide Regulations for Mycotoxins. A Compendium*. FAO food and Nutrition Paper, Roma, n. 64, 2002.

Frisvad JC, Samson RA. Filamentous fungi and feeds: ecology, spoilage and mycotoxins productions. In: *Handbook of Applied Mycology*, v. 3: Food and Feeds. Dilip K, Arora KG, Mukerji E, Marth H. (Eds.). Marcel Dekker, Inc. New York: 31-68, 1991.

Gompertz OF, Gambale W, Paula CR, Corrêa B. Características gerais dos fungos. In: *Microbiologia*. Trabulsi LR, Althertum F. (Eds.). Atheneu, 5nd ed.: 479-491, 2008.

Helferich W, Winter CK. *Food Toxicology*. Boca Raton: CRC Press: 106-112, 2001.

Hesseltine CW. Natural occurrence of mycotoxins in cereals. *Mycopathologia Mycology Applied* 53: 141-153, 1974.

Hocking AD, Pitt JI, Thrane U. *Advances in Food Mycology*. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York: Springer, V. 571, 2006.

International Agency for Research on Cancer (IARC). *Toxins derived from Fusarium moniliforme: fumonisin B₁ and B₂ and Fusarin C (Group 2B)*. Lyon: IARC Scientific publications, n. 56, 1993a.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Aflatoxins: Natural occurring aflatoxins (Group 1), aflatoxin M₁ (Group 2B). Lyon: IARC Scientific publications, n. 56, 1993b.

Jackson LS, DeVries JW, Bullerman LB. Fumonisin in Food. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. New York: Plenum Press, v. 392, 1996.

Lacey J. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of food and other products. In: Filamentous Fungi in Food and Feeds. In: Moss MO, Jarvis B, Skinner FA (Eds.) Published for the Society for Applied Bacteriology, Blackwell Scientific Publications: 11-25, 1989.

Leslie JF, Bandyopadhyay R, Visconti A. In: Mycotoxins-Detection Methods, Management. Public Health and Agricultural Trade. UK: CAB International, 2008.

Miler JD, Trenholm HL. Mycotoxins in Grain: compounds other than Aflatoxin. St. Paul: Eagon Press, 1994.

Moore-Landecker E. Fundamentals of the Fungi. 4th ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 1994.

Northolt MD, Soentoro PSS. Fungal growth on foodstuffs related to mycotoxin contamination. In: Samson RA, Van Reenen-Hoekstra ES, Van Dorsthot CAN. Introduction to food borne fungi. Baarn, CBS: 231-238, 1988.

Pier AC. Mycotoxins and Mycotoxicoses. In: Biberstein EL, Zee YC (Eds.). Veterinary Microbiology. Boston: Blackwell Scientific Publications Inc.: 348-355, 1990.

Pitt JI, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage. 2nd London: Blackie Academic 7 Professional, 1997.

Rodriguez-Amaya D, Sabino M. Mycotoxin Research in Brazil: The last decade in review. Brazilian Journal of Microbiology 33:1-11, 2002.

Scussel VM, da Rocha MW, Lorini I, Sabino M, Rosa CAR, Carvalhal MM. Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos 2nd Ed. Florianópolis: ABMAG, v. 1, 2008.

Sharma RP. Immunotoxicity of Mycotoxins. Journal of Dairy Science 76(3):892-897, 1993.

Steyn PS. Mycotoxins, excluding aflatoxins, zearalenone and trichothecenes. In: Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA. (Eds.). Mycotoxins in Human and Animal Health. Illinois: Pathotox Publishers 419-467, 1977.

