

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**  
**CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**WÂNIA SOARES DE OLIVEIRA MEDEIROS**

**MATERIAIS E TECNOLOGIA ASSOCIADOS PARA DETECÇÃO DE**  
**MICOTOXINAS**

**BELO HORIZONTE**

**2021**

WÂNIA SOARES DE OLIVEIRA MEDEIROS

**MATERIAIS E TECNOLOGIA ASSOCIADOS PARA DETECÇÃO DE  
MICOTOXINAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

**Orientador:** Dr. Nilton da Silva Maia

**Coorientador:** Dr. Luís Roberto Batista

BELO HORIZONTE

2021

WÂNIA SOARES DE OLIVEIRA MEDEIROS

**MATERIAIS E TECNOLOGIA ASSOCIADOS PARA DETECÇÃO DE  
MICOTOXINAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Aprovado em 08 / 04 / 2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Nilton da Silva Maia

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Magalhães

---

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que é a minha base, concessor da minha força vital e pilar da minha fé, és minha fonte de segura de que dias melhores virão;

A minha amada avó (*in memorian*), que tanta falta me faz, infelizmente não está aqui para presenciar o fim dessa batalha e dar seu caloroso abraço, mas estará eternamente em meu coração;

Aos meus queridos e amados pais que me deram a vida, acreditaram em mim, investiram seu tempo e energia, e me transformaram na pessoa que sou e aos meus irmãos Amélia e Danilo por me ensinarem o que é compartilhar, foi com vocês que aprendi o verdadeiro significado do companheirismo;

Aos meus pequenos, Alice, Joana, Bernardo e nosso pacotinho José Luiz...que trazem inocência e alegria para minha vida;

Ao meu amado marido Augusto, que em todos os momentos de ausência para cumprindo das minhas tarefas acadêmicas nunca reclamou, pelo contrário, sempre esteve ao meu lado incondicionalmente;

Em especial ao meu Orientador e amigo professor Nilton, que embarcou em um assunto totalmente novo, me oferecendo seu voto de confiança e o meu coorientador professor Luís, com tanta simpatia e bondade fez da distância um mero detalhe no mapa, afinal somos mineiros, nada está tão longe ... tudo é logo ali. Não posso deixar de expressar minha gratidão aos professores Aline Magalhães e Sidney, por tudo que me ensinaram ao longo desse caminho e por me concederem o privilégio de compor minha banca avaliadora.

Não poderia deixar de agradecer minha querida amiga Maria Eunice, pois tudo que aprendi sobre às técnicas analíticas relacionadas a micotoxinas devo a essa graciosa moça de Matozinhos que doou seu tempo, energia e principalmente seu conhecimento em meu benefício. Parte do meu saber e amadurecimento profissional, foram lapidados por você

quando ministrou o treinamento no Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Aos amigos que o CEFET me presenteou ao longo dessa jornada chamada graduação, meu muito obrigada...muitos foram os desafios, mas superamos cada um deles. Alguns casos são mais marcantes, não é descaso com meus outros amigos, mas não poderia deixar de mencionar e demonstrar minha gratidão especial a ela, minha irmãzinha da família CEFET ... pelas risadas, companhia e apoio incondicional em cada prova que aparecia em nosso caminho, pelas conversas, conselhos, passeio na viatura da polícia militar, kkk, muitos momentos divertidos. Mas amizade parece casamento, a famosa frase na alegria e na tristeza se encaixa perfeitamente bem, pois no momento mais difícil que passei durante esse percurso você esteve ao meu lado, chorou e sofreu junto comigo ao ver a dor que senti quando perdi “meu chaveirinho” era como eu chamava minha querida e amada avó, quem conhece nossa parceria já sabe de quem estou falando, minha amiga Grazi mais conhecida como Greg. O que eu posso dizer a você? Cris e Greg ontem, Cris e Greg amanhã, Cris e Greg sempre, você foi fundamental nessa jornada, quero levar essa amizade pra vida, muito além dos muros dessa instituição, a você irmãzinha, minha eterna gratidão. Douglas e Barbara vocês são meus parceiros queridos, não poderia deixar de mencionar os ótimos momentos que passamos juntos, nossa parceria fez dessa trajetória muito mais leve e mais florida, amo vocês!

A todos os amigos que conquistei ao longo durante esse percurso...que sorriram e choraram ao meu lado, que torceram por essa conquista, pois agora falta bem pouco para cruzarmos a linha de chegada e vai ser muito bom fazer isso ao lado de vocês.

Acabou pessoal...agora é só comemorar, a vitória é nossa.

A todos meus sinceros agradecimentos!

*“Não se contente em trilhar um caminho estabelecido. Ao contrário vá para onde não há caminho algum e deixe seu rastro.”*

(Johnnie Walker)

## RESUMO

As micotoxinas tem se constituído um perigo bem iminente, e podem estar escondidas nos alimentos que trazemos para nossa casa. É preciso estarmos alertas, pois as variadas micotoxicoses abordadas neste estudo podem causar doenças severas de potencial carcinogênico em humanos e animais mesmo quando encontradas em baixas concentrações. O controle da ocorrência e da taxa de proliferação dos fungos produtores de micotoxinas tem se tornado fundamental, mas também altamente complexo, pois é um contaminante natural e seu desenvolvimento está intimamente associado às condições ambientais, como temperatura e umidade atmosférica, além de situações que fogem ao nosso controle, como os períodos chuvosos. Ao longo da discussão apresenta-se uma abordagem das cinco principais micotoxinas: aflatoxinas (AFs), fumonisinas (FBs), ocratoxinas (OTs), desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEN) e os impactos gerados por elas nas áreas da saúde, economia. De acordo com a FAO-ONU (Food and Agriculture Organization of the United Nations), cerca de 25% das culturas mundiais são contaminadas por micotoxinas anualmente. Os prejuízos são alarmantes, causando déficit de bilhões em cofres públicos, valores que superam o PIB de muitos países. Aborda-se as principais tecnologias utilizadas na detecção de micotoxinas, de forma qualitativa e quantitativa, passando por aspectos relacionados a abordagem e extração e algumas renomadas técnicas cromatográficas e biossensores, salientando os pontos relevantes de cada uma delas. Por fim a introdução do uso de adsorventes como grandes facilitadores na saga pelo controle e extermínio da praga, com destaque para o óxido de grafeno com suas admiráveis características, quer isoladamente ou na forma de compósitos, pois quando associados a outras matérias primas apresenta um somatório de boas características e isso se revelou uma boa alternativa para contenção das micotoxinas. O campo de pesquisa nesta área é consideravelmente amplo e ficou evidente que ainda há muito a ser explorado, não apenas relacionado ao desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas a novos produtos, mas também a melhorias de produtos e processos que estão em voga.

**Palavras-chave:** Micotoxinas, cromatografia, óxido de grafeno, nanocompósitos e adsorventes.

## ABSTRACT

Mycotoxins have been a very imminent danger, and can be hidden in the food we bring to our home. We need to be alert, as the various mycotoxicoses addressed in this study can cause severe diseases of carcinogenic potential in humans and animals even when found in low concentrations. Controlling the occurrence and proliferation rate of mycotoxin-producing fungi has become fundamental, but also highly complex, as it is a natural contaminant and its development is closely associated with environmental conditions, such as temperature and atmospheric humidity, in addition to situations that escape our control, like the rainy periods. Throughout the discussion an approach is presented to the five main mycotoxins: aflatoxins (AFs), fumonisins (FBs), ochratoxins (OTs), deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) and the impacts generated by them in the areas of health, economics. According to the FAO-UN (Food and Agriculture Organization of the United Nations), about 25% of world cultures are contaminated by mycotoxins annually. The losses are alarming, causing a deficit of billions in public coffers, values that exceed the GDP of many countries. It addresses the main technologies used in the detection of mycotoxins, qualitatively and quantitatively, passing through aspects related to the approach and extraction and some renowned chromatographic and biosensor techniques, highlighting the relevant points of each one. Lastly, the introduction of the use of adsorbents as major facilitators in the saga for the control and extermination of the pest, with emphasis on graphene oxide with its admirable characteristics, either alone or in the form of composites, because when associated with other raw materials it presents a sum of good characteristics and this proved to be a good alternative for containing mycotoxins. The research field in this area is considerably broad and it was very evident that there is still a lot to be explored, not only related to the development of new technologies applied to new products, but it is also fully applicable to improvements of products and processes that are in vogue.

**Keywords:** Mycotoxins, chromatography, graphene oxide, nanocomposites and adsorbents.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alguns alimentos <i>in natura</i> e industrializados os quais são alvos das micotoxinas	16
Figura 2 – Fatores que contribuem para disseminação das micotoxinas	17
Figura 3 – Microscopia de conídios do fungo <i>Aspergillus flavus</i> , com conidiósporos em brotamento e em liberação	21
Figura 4 – Estrutura química das classes de Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2	22
Figura 5 – Alimentos contaminados por aflatoxinas no DF entre 07/1998 a 12/2000	23
Figura 6 – Alimentos contaminados por aflatoxinas no DF entre 07/1998 a 12/200020	23
Figura 7 – Amendoim e alimentos derivados do grão contaminados por aflatoxinas no DF em 2001	25
Figura 8 – Mosaico um cultivo de <i>Fusarium sp.</i> aumentado em 800X, uma espiga de milho e um colmo de milho acometidos por fumonisina	25
Figura 9 – Estrutura química da Ocratoxina A OTA	26
Figura 10 – Fungos potencialmente ocratoxígenos em café	27
Figura 11 – Estrutura química da Desoxinivalenol DON	28
Figura 12 – Estrutura química da Zearalenona ZEN	29
Figura 13 – Sinais clínicos advindos da contaminação por Zearalenona e a sensibilidade por espécie	30
Figura 14 – Esquematização de um cromatógrafo líquido	34
Figura 15 – Esquematização de um espectrômetro de massas	35
Figura 16 – Diagrama do funcionamento do cromatógrafo gasoso	36
Figura 17 – Esquema do princípio básico da técnica TLC	37
Figura 18 – Cuba cromatográfica com placa em eluição e pós-eluição	37
Figura 19 – Esquema da organização dos componentes de um Biossensor	38
Figura 20 – Matérias-primas dos adsorventes de micotoxinas disponíveis no mercado	40
Figura 21 – Representação tridimensional da estrutura molecular do óxido de grafeno	41

Figura 22 – Possibilidades de interações com variadas moléculas de micotoxinas devido aos anéis aromáticos presentes em sua estrutura e determinados grupos funcionais 43

Figura 23 – Demonstração de como retirar os dados necessários para o cálculo do Rf de uma amostra aplicada e dos componentes que constituem sua composição 48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens X limitações dos biossensores na detecção de micotoxinas	39
Tabela 2 – GO e seus compostos e a eficiência na adsorção de diversas micotoxinas de alimentos e rações	45
Tabela 3 – Vantagens apresentadas pelas técnicas cromatográficas, HPLC e CG	50
Tabela 4 – Levantamento de preços de cromatógrafos Líquido e gasoso e alguns de seus acessórios	51

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AFs – Aflatoxinas  
FBs – Fumonisinias  
OTs – Ocratoxinas  
OTA – Ocratoxina A  
DON – Desonivalenol  
ZEN – Zearalenona  
AFB1 – Aflatoxina B1  
AFB2 – Aflatoxina B2  
AFG1 – Aflatoxina G1  
AFG2 – Aflatoxina G2  
UV – Ultravioleta  
Rf – Fator de Retenção  
CCD – Cromatografia em Camada Delgada  
IARC - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer  
DF – Distrito Federal  
FDA - Food and Drug Administration  
EUA - United States of America  
EU – União Européia  
RNA - Ácido Ribonucléico  
DNA - Ácido Desoxirribonucléico  
FHB - Ferrugem da Cabeça do *Fusarium*  
NIV – Nivalenol  
PPC - puberdade precoce central  
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência  
GC - Cromatografia Gasosa  
MS - Espectrômetro de Massa  
RIA - Radioimunoensaio  
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática  
ICA - Ensaio de Coluna de Imunidade  
FTIR - Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier  
NIR - Reflexo Infravermelho Próximo

ACN - Acetonitrila

LC – Cromatografia Líquida

LC/MS - Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massas

HRMS - Espectrometria de Massa de Alta Resolução

ECD - Detector de captura de elétrons

FID - Ionização de Chama

TLC - Cromatografia em Camada Fina

SPR - Ressonância Plasmon de Superfície

QCM – Microbalança de Cristal de Quartzo

pH – Potencial Hidrogeniônico

3D – Terceira Dimensão

GO – Óxido de Grafeno

Pb – Chumbo

Hg – Mercúrio

Cd – Cádmio

CO – Óxido de Carbono

ATB – Antibióticos

MGO - Partículas Magnéticas de Óxido de Grafeno

Fe – Ferro

UV-VIS – Ultravioleta Visível

FAO-ONU - Food and Agriculture Organization of the United Nations

Ppb – Partes por bilhão

DDGS - dried distillers' grain and solubles

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Principais espécies de fungos produtores de micotoxinas</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Micotoxinas</b>	<b>21</b>
3.2.1	Aflatoxinas e os impactos na saúde humana	21
3.2.2	Fumonisinias e os impactos na saúde humana	24
3.2.3	Ocratoxinas e os impactos na saúde humana	26
3.2.4	Desoxinivalenol e os impactos na saúde humana	27
3.2.5	Zearalenona os impactos na saúde humana	28
<b>3.3</b>	<b>Métodos de análises para detecção de micotoxinas em alimentos</b>	<b>30</b>
3.3.1	Análise qualitativa e quantitativa	30
3.3.2	Amostragem	32
3.3.3	Extração	32
3.3.4	Cromatografia Líquida	33
3.3.5	Cromatografia Gasosa	35
3.3.6	Cromatografia em Camada Fina	36
3.3.7	Biossensores	37
3.3.8	Adsorventes de Micotoxinas	39
3.3.9	Óxido de Grafeno – GO	41
3.3.9.1	Algumas particularidades do óxido de grafeno e seu potencial de interação com moléculas específicas	42
3.3.9.2	Nanocompósitos a base de GO	44

<b>4</b>	<b>ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS DE ANÁLISE APRESENTADOS, INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS E INSERÇÃO DE NOVOS MATERIAIS PRESENTES NO MERCADO PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>IMPACTOS ECONÔMICOS RELACIONADOS ÀS MICOTOXINAS</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O termo micotoxinas descreve uma classe de substâncias químicas metabolizadas por algumas espécies de fungos filamentosos durante seu desenvolvimento que podem causar doenças em humanos e animais mesmo em baixas concentrações. Controlar a ocorrência e taxa de proliferação dos fungos produtores de micotoxinas é altamente complexo, pois trata-se de um contaminante natural e o desenvolvimento dos fungos são influenciados pelas condições ambientais, como temperatura e umidade. As micotoxinas podem ser detectadas nos mais variados grupos de grãos e conseqüentemente em alimentos derivados dos mesmos após processamento e industrialização (figura 1). Um agravante relacionado às micotoxinas, é que elas podem permanecer retidas nos alimentos mesmo após a eliminação dos fungos que a produziram, e a maioria delas são resistentes ao tratamento térmico sofrido pelos alimentos na torrefação e pasteurização (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010).

**Figura 1 – Alguns alimentos in natura e industrializados os quais são alvos das micotoxinas.**



Fonte: Adaptado de AGROINDUSTRIAIS, 2021.

As doenças causadas por toxinas fúngicas eram desconhecidas até o início de 1960, quando um surto ocorrido no Reino Unido culminou em alta taxa de mortalidade

em perus. A mortalidade foi associada ao consumo de ração a base de amendoim produzido no Brasil que estava contaminada por micélios de *Aspergillus flavus*, e posteriormente foi identificado como responsável pela produção das aflatoxinas. A partir de então o interesse por esta área de pesquisa cresceu significativamente levando ao aumento de publicações sobre estes tipos de toxinas e as consequências que as mesmas podem causar à saúde humana e animal. É super importante estar atento aos fatores que favorecem a proliferação das micotoxinas, para evitar o aumento dessa proliferação (figura 2). Foram implementadas medidas de controle para conter níveis elevados de contaminação, pois ocorrem mais especificamente em grãos e sementes oleaginosas, alimentos consumidos frequentemente pela população em geral. Uma das ações adotadas foi uma rigorosa fiscalização pois estas toxinas poderiam apresentar efeitos carcinogênicos, além de uma atenção especial ao risco de desenvolvimento dos fungos produtores de micotoxinas durante o período de transporte e armazenagem desses grãos em condições inadequadas. Outra questão fundamental é determinar a etiologia de doenças degenerativas ou crônicas como câncer, pois podem ser advindas de micotoxinas presentes em grãos contaminados (VETTORAZZI; CERAIN, 2015).

**Figura 2 – Fatores que contribuem para disseminação das micotoxinas.**



Fonte: Adaptado de CARNEIRO, 2020.

Entre os variados efeitos tóxicos, agudos e crônicos detectados em pessoas e animais, acometidos por intoxicação micológica estão listados distúrbios gastrointestinais, imunológicos, hepáticos ou renais, além das propriedades carcinogênicas citadas anteriormente. Controlar e regulamentar os níveis de micotoxinas presentes nos alimentos se tornou uma necessidade pública, e esse requisito tem sido acatado por meio do estabelecimento de legislações que limitam os níveis de toxinas nos alimentos, visto que afetam diretamente a saúde do consumidor além de impactar a economia que gira em torno do agronegócio. Para que essas ações sejam efetivas, é necessário traçar estratégias que permitam avaliar os riscos envolvidos quanto a exposição a toxicidade que as micotoxinas podem causar, bem como desenvolver e aprimorar ferramentas analíticas que qualifiquem e quantifiquem traços dessas substâncias presentes nos alimentos, isso permite assegurar a saúde de homens e animais além atuar minimizando possíveis prejuízos econômicos (VETTORAZZI; CERAIN, 2015).

Diante de todos os riscos e consequências relacionados à exposição às micotoxinas e as diversas realidades econômicas encontradas no cenário mundial, faz necessário o aperfeiçoamento de técnicas analíticas para detecção das micotoxinas bem como buscar inovações que sejam capazes de qualificar e quantificar traços mínimos de toxinas com alta exatidão e repetibilidade. Sem deixar de lado a qualidade dos trabalhos e as viabilidades técnica e econômica na execução de tais análises, com o objetivo de evitar o descarte de toneladas de grãos e conseqüentemente prejuízo econômico além de preservar a saúde de humanos e animais, foco principal do estudo.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar de forma comparativa os métodos analíticos utilizados na detecção de micotoxinas em alimentos, bem como as inovações e novos materiais neste segmento de pesquisa.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Pesquisar as técnicas analíticas mais utilizadas nos últimos anos, e avaliar o desempenho de cada uma delas.
- Divulgar novos materiais e suas determinadas aplicações no ramo de micotoxinas.
- Apontar as técnicas analíticas em evidência;
- Fazer comparações metodológicas de acordo com desempenho e custos com implantação e mão de obra qualificada.
- Mostrar a relevância, vantagens e desvantagens dos métodos e materiais abordados.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Principais espécies de fungos produtores de micotoxinas

As micotoxinas são substâncias metabolizadas por espécies variadas de fungos, capazes de contaminar uma vasta quantidade de produtos alimentares. Mesmo que sejam adotadas medidas de controle, com limites regulatórios rígidos para combater a contaminação, não é uma tarefa fácil, pois os fungos se espalham pelo ambiente, quer seja no campo antes e após a colheita e principalmente durante o transporte e estocagem dos alimentos (SHANAKHAT *et al.*, 2018).

Segundo Balendres, Karlovsky e Cumagun (2019) dentre as milhares de espécies de fungos catalogados, doze tem origem micotoxigênica e alguns alimentos sofrem mais ataques por parte deles. As espécies de fungos estão subdivididas em grupos onde temos *Fusarium sp.*, *Penicillium* e o *Aspergillus sp.*

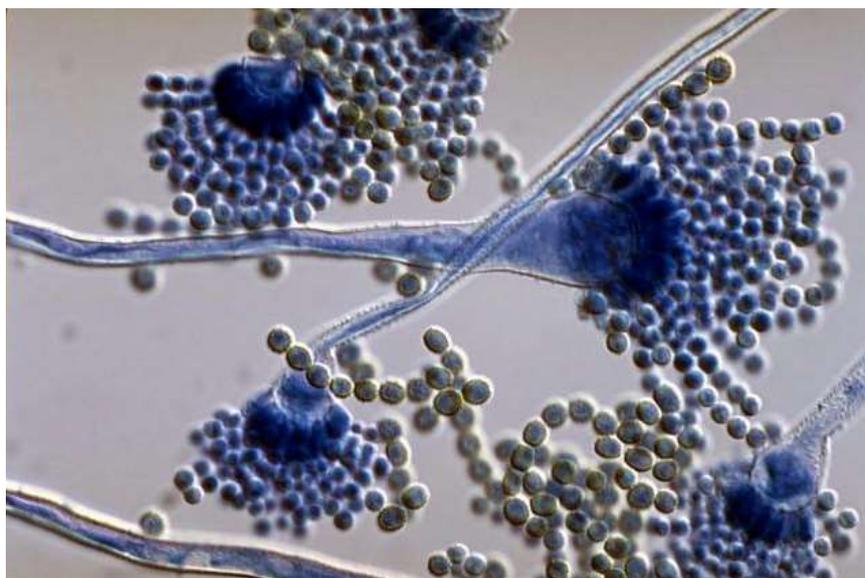
Dados da literatura dos períodos de 2008 a 2018 que relatam sobre a ocorrência das micotoxinas geralmente mais detectadas em grãos e alimentos derivados de cereais, que são: as aflatoxinas (AFs), fumonisinas (FBs), ocratoxinas (OTs), desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEN). Um agravante é que as micotoxinas podem ser transmitidas facilmente para o produto alimentar processado. O processamento de alimento além de ser uma atividade que agrega valores, é também a última etapa para criação de barreiras para evitar a contaminação por micotoxinas no produto acabado. Mas a contaminação durante o processamento depende de características físico-químicas das micotoxinas não apenas nos grãos crus mas também avaliação das condições e parâmetros de processamento além das condições ambientais que favorecem a proliferação. Há décadas vários pesquisadores tem apostado em estratégias para intervenção do avanço das contaminações, mas o foco principal foi: (a) as propriedades físico-químicas das micotoxinas em grãos de cereais e alimentos à base dos mesmos e o impacto causado na saúde; (b) o destino das micotoxinas durante o processamento de vários alimentos; e (c) estratégias potenciais para o controle de crescimento de fungos tóxicos e produção de micotoxinas em grãos de cereais e durante na etapa de processamento de alimentos (WAN; CHEN; RAO, 2020).

## 3.2 Micotoxinas

### 3.2.1 Aflatoxinas e os impactos na saúde humana

Segundo Wan, Chen e Rao (2020) os principais produtores de aflatoxinas são os fungos da espécie *Aspergillus* (figura 3), comumente encontrado como contaminantes de nozes e variados grãos de cereais e se reproduz com facilidade em ambiente quente e úmido. Geralmente a propagação da contaminação por aflatoxina acontece após o período de colheita, e o aumento de concentração dessa contaminação pode ser agravado durante transporte e armazenamento, pois altas temperaturas e umidade atuam como facilitadores na proliferação de aflatoxinas (AFs).

**Figura 3 – Microscopia de conídios do fungo *Aspergillus flavus*, com conidiósporos em brotamento e em liberação.**

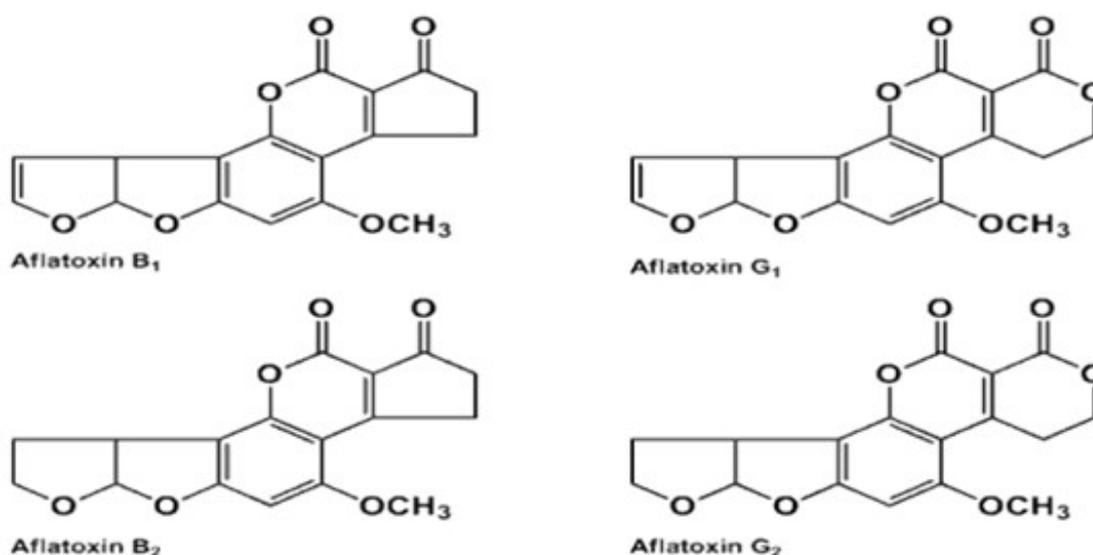


Fonte: ILDIKÓ, 2021.

As aflatoxinas pertencem a uma classe derivada da difuranocumarina, tem-se conhecimento de quatro tipos Aflatoxinas naturais, Aflatoxina B1, B2, G1 e G2 (figura 4) as quais foram batizadas de acordo com as cores que emitiam sob a luz ultravioleta (UV), ao fator de retenção (Rf) apresentado na cromatografia em camada delgada (CCD).

A letra B representa a cor de fluorescência azul e a letra G para fluorescência verde e os números retratam a mobilidade das aflatoxinas, sendo que o número 1 possui maior Rf. As aflatoxinas podem produzir toxicidade de grau aguda à crônica a aflatoxina B1 constitui-se a mais tóxica delas em contraste com a G2 que possui menor toxicidade. A agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), classifica a aflatoxina B1 (AFB1) como agente carcinogênico do grupo 1 para seres humanos, em seguida pode ser vista a estrutura química da toxina (WAN; CHEN; RAO, 2020).

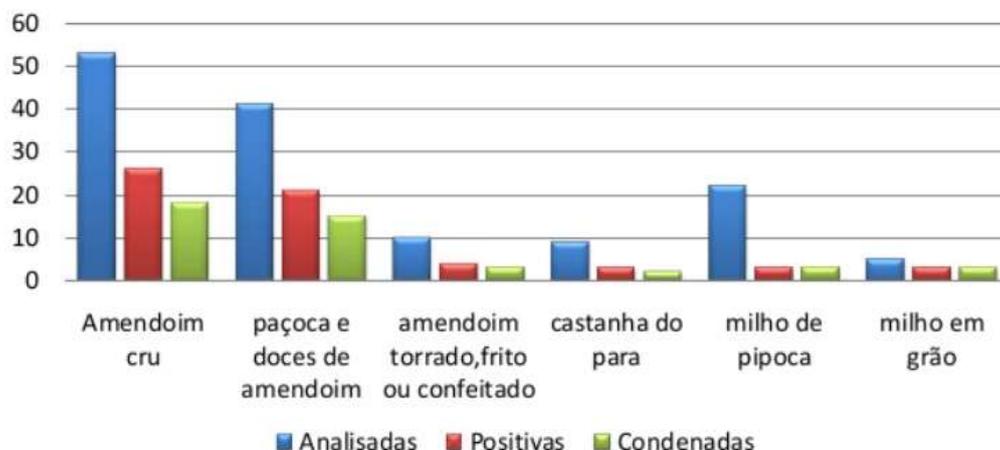
**Figura 4 – Estrutura química das classes de Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.**



Fonte: SÁ, 2017.

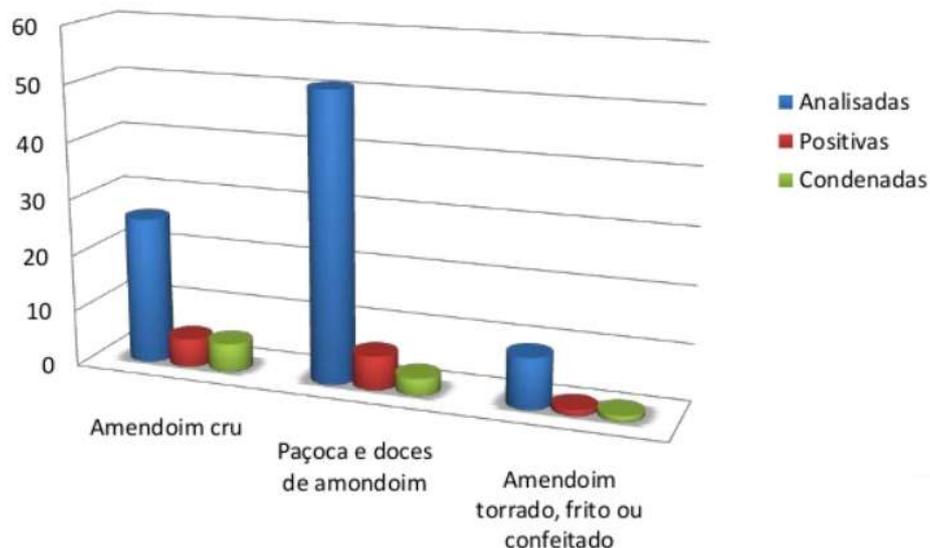
Ao contrário do que muitos pensam, as micotoxinas estão mais perto do que imaginamos. Isso pode ser provado analisando as figuras 5 e 6 a seguir que mostra a contaminação por AFs em alimentos bem populares e bastante consumidos pela maioria da população. O levantamento foi realizado no Distrito Federal (DF) no período que compreende julho de 1998 e dezembro de 2000.

**Figura 5 – Alimentos contaminados por aflatoxinas no DF entre 07/1998 a 12/2000.**



Fonte: FERREIRA; VIECELI; PRATES, 2001.

**Figura 6 – Amendoim e alimentos derivados do grão contaminados por aflatoxinas no DF em 2001.**



Fonte: FERREIRA; VIECELI; PRATES, 2001.

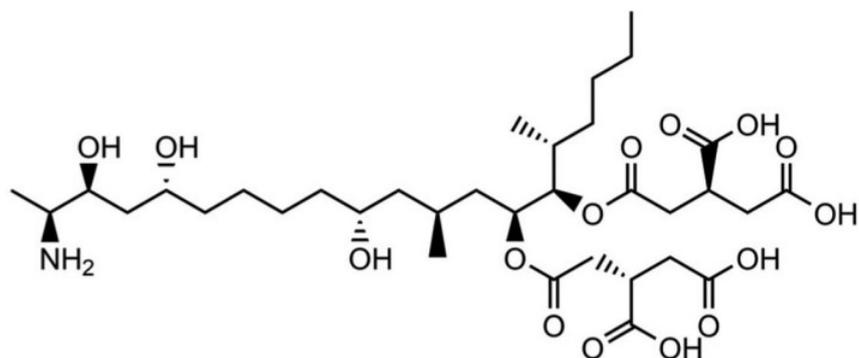
Consumir alimentos contaminados por AFs pode levar o indivíduo a contrair várias doenças, as quais a gravidade só poderá ser mensurada a partir da quantidade consumida e a duração da exposição do paciente à aflatoxina, causando as chamadas

aflatoxicoses, quando agudas causam vômito, hemorragia, dor abdominal, icterícia, pulmonar, edema cerebral, coma, convulsões e pode levar a óbito. A ocorrência de aflatoxicose crônica, pode induzir ao desenvolvimento de tumores ou outra situação patológica negativa além de suprimir a função imunológica, em caso de exposição à longo prazo a AFs está intimamente relacionada ao crescimento e comprometimento cognitivo em crianças. Alimentos para consumo humano são rigorosamente controlados pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, a qual estabeleceu que o nível de AFs em cereais e alimentos à base de cereais deve ser inferior a 20 µg/kg. Curiosamente, o único grupo de micotoxinas para o qual o FDA estabeleceu níveis de aconselhamento e de ação, foi para as AFs. Outros países também estabeleceram limites máximos de AFs para variados alimentos, vale ressaltar que a União Européia (EU) possui o limite de tolerância mais rigoroso de que se tem conhecimento para AFs (WAN; CHEN; RAO, 2020).

### 3.2.2 Fumonisinias e os impactos na saúde humana

De acordo com Wan, Chen e Rao (2020), as fumonisinias (FBs) são produzidas principalmente pelo grupo *Fusarium verticillioides* (syn. *Fusarium moniliforme*) e *Fusarium proliferatum*, diferentemente de algumas outras micotoxinas não produzem fluorescência. Os cereais mais susceptíveis ao ataque das FBs são milho, trigo, sorgo e cevada, a figura 8, mostra um mosaico e o aspecto de uma cultura contaminada pelo *Fusarium sp.*. As fumonisinias são um grupo de compostos de diéster que consiste em uma variedade de ácidos tricarbóxicos e álcoois poliídricos e uma porção amina. Atualmente, mais de 30 homólogos de FBs foram identificados e o número tende a aumentar, podem ser divididos em quatro grupos (A, B, C e P) baseando-se em sua estrutura química, dentro dos grupos FBs, FB1 (Figura 7) é o membro FB mais prevalente e com maior toxicidade, respondendo por 70% a 80% de toda a família de Fumonisinias.

**Figura 7 – Estrutura química da Fumonisina FB1.**



Fonte: WAN, *et. al.*; 2020.

**Figura 8 – Mosaico um cultivo de *Fusarium sp.* aumentado em 800X, uma espiga de milho e um colmo de milho acometidos por fumonisina.**



Fonte: Adaptado de ISAKEIT, 2017.

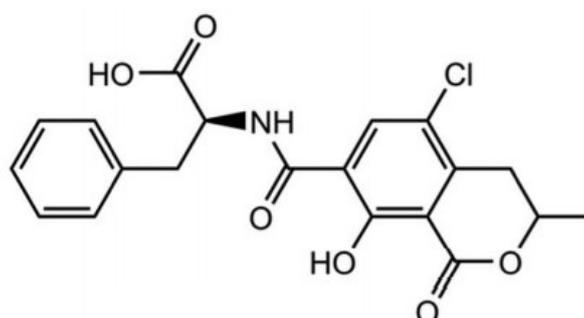
Quanto ao consumo de alimentos contaminados por FBs, a África do Sul nos trouxe o primeiro relato, o consumo de milho contaminado resultou em alta incidência de

câncer de esôfago, essa correlação foi posteriormente confirmada em casos encontrados na China e Itália. Há relatos sobre a exposição a altos níveis de fumonisinas em mulheres grávidas associado a um risco crescente de má formação do tubo neural em bebês. Entre os membros da família das FBs, o FB1 é responsável pela carcinogenicidade, a regulamentação de acordo com o FDA, estabeleceu-se o nível máximo recomendado de fumonisinas entre 2 a 4 mg/kg em alimentos processados derivados de milho para consumo humano (WAN; CHEN; RAO, 2020).

### 3.2.3 Ocratoxinas e os impactos na saúde humana

Os autores Wan, Chen e Rao (2020), informaram que a ocratoxina (OTs) é uma espécie de micotoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, e *Penicillium verrucosum*. A ocratoxina ataca grãos como feijão, milho, trigo e cevada e café. A OTs pode ser classificada baseando em seu grupo funcional característico, e podem ser divididos em três grupos, ocratoxina A (OTA), o derivado fenilalanil de uma isocumarina substituída (Figura 9), é o membro mais tóxico do grupo das OTs. Estudos associados a ingestão alimentar, apontam que a OTA pode se ligar às proteínas plasmáticas através do trato gastrointestinal e se acumular nos rins.

**Figura 9 – Estrutura química da Ocratoxina A OTA**

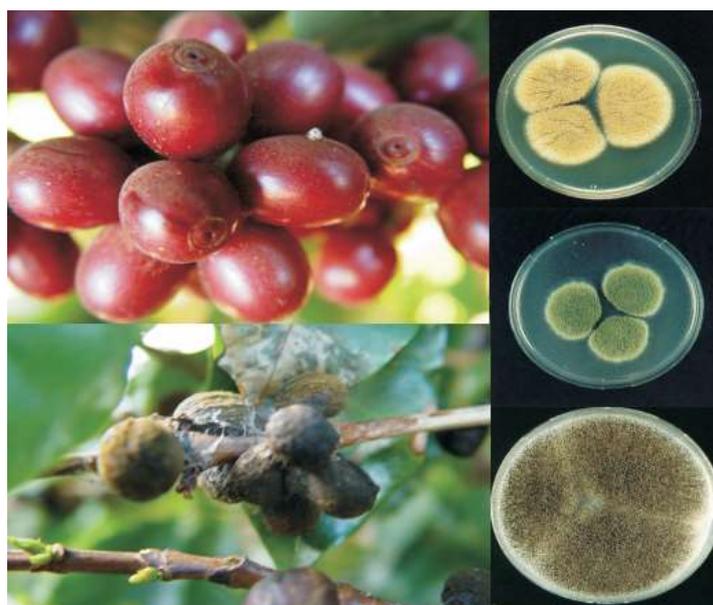


Fonte: WAN, *et. al*; 2020.

Além disso, OTA pode competir com fenilalanina hidroxilase no rim e fígado e inibir a síntese de certas proteínas, como a síntese de ácido ribonucléico (RNA) e do ácido desoxirribonucléico (DNA), causando nefrotoxicidade aguda e hepatotoxicidade. A

figura 10 ilustra a diferença da aparência de grãos de café sadios e os contaminados por OTA, e também exibe algumas placas microbiológicas com crescimento fúngico da micotoxina. Até o presente momento, o FDA não estabeleceu regulamentação sobre o teor de OTA nos alimentos, em contrapartida a UE determinou limites de OTA entre 3 e 5 mg/kg para produtos alimentícios crus e à base de cereais (WAN; CHEN; RAO, 2020).

**Figura 10 – Fungos potencialmente ocratoxígenos em café.**

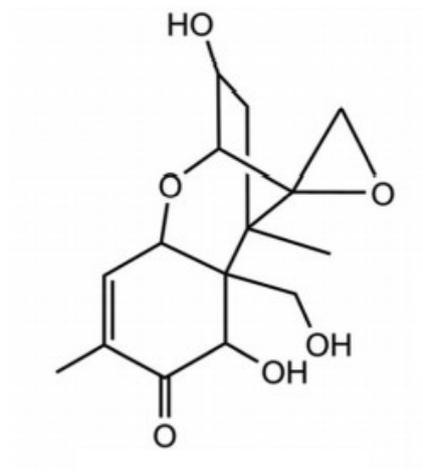


Fonte: MAPA, 2003.

#### 3.2.4 Desoxinivalenol e os impactos na saúde humana

Desoxinilevanol (DON) são micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* que pode ser propagado no campo, durante o armazenamento pós-colheita. Ambos *Fusarium* os fungos são as principais espécies que causam a ferrugem da cabeça do *fusarium* (FHB), uma praga específica da cultura de cereais manifesta-se em trigo, cevada, milho, aveia e centeio. Quimicamente, DON pertence a um tricoteceno tipo B com uma cetona característica em C8 e três grupos hidroxila em C3, C7 e C15 (Figura 11) (WAN; CHEN; RAO, 2020).

**Figura 11 – Estrutura química da Desoxinivalenol DON**



Fonte: WAN, *et. al*; 2020.

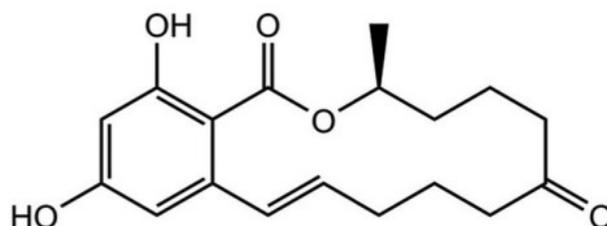
O anel epóxido dos tricotecenos é essencial para a toxicidade e é estável ao pH e ao calor em solução, geralmente o DON acetilado e o NIV (Nivalenol) são produzidos simultaneamente nos fungos. Com relação aos aspectos de toxicidade aguda, alimentos contaminados por exposição ao DON, pode causar desconfortos como náuseas, diarreia, dor abdominal, cefaleia, febre e vômito. Estudos realizados com animais revelaram que os mesmos foram acometidos a toxicidade aguda, em consequência tiveram a morfologia e a função intestinal afetados, isso comprovado após o consumo de alimentos que sofreram exposição prolongada a uma baixa concentração de DON. Em humanos tal exposição ainda não é clara, mas estudos epidemiológicos em modelos animais têm sido amplamente utilizados como base padrão para o estabelecimento de limites regulatórios. Do ponto de vista da saúde humana, o DON é classificado no Grupo 3, ou seja, não classificável quanto à sua carcinogenicidade pela IARC (WAN; CHEN; RAO, 2020).

### 3.2.5 Zearalenona os impactos na saúde humana

Segundo Wan, Chen e Rao (2020), a Zearalenona (ZEN) é a única micotoxina estrogênica não esteroide de ocorrência natural, é caracterizada por uma estrutura macrocíclica (Figura 12), é produzida por espécies variadas de *Fusarium*, tais como *F. culmorum*, *F. graminearum*, e *F. sporotrichioides*, é frequentemente encontrada em milho, cevada, trigo, aveia, arroz, centeio e sorgo locais de clima temperado. A

propagação da ZEN ocorre principalmente no campo, mas também em condições não adequadas de armazenamento dos grãos, como já citado no caso das outras micotoxinas a umidade é um agravante, quando superior a faixa de 30% a 40%.

**Figura 12 – Estrutura química da Zearalenona ZEN**

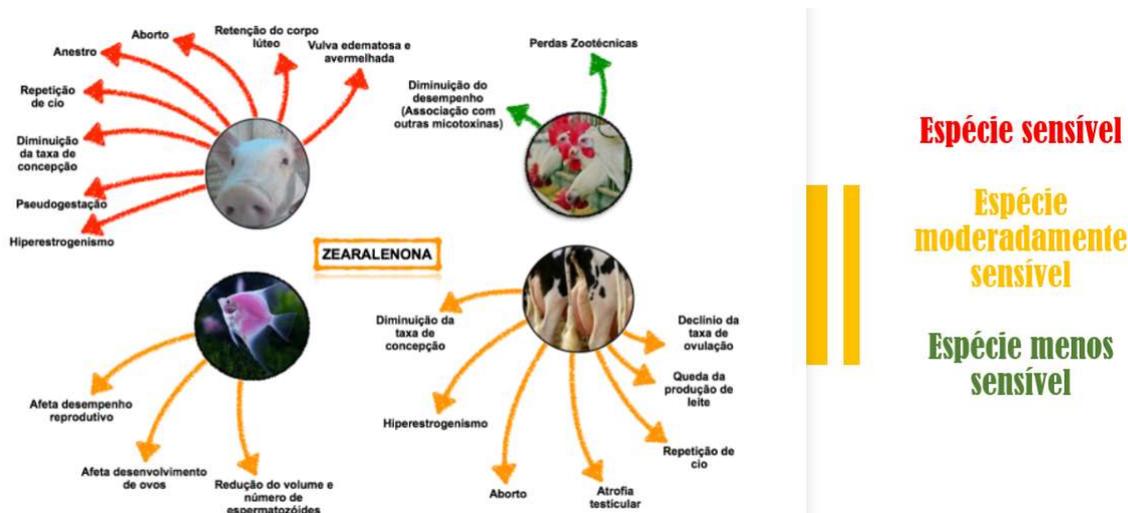


Fonte: WAN, *et. al*; 2020.

O fungo que produz ZEN é o mesmo que produz DON, devido a essa particularidade os grãos contaminados costumam apresentar ambas as micotoxinas. Semelhante à maioria das micotoxinas, a ZEN é difícil remoção durante o processamento de alimentos devido à sua alta estabilidade térmica que a toxina apresenta. Produtos à base de cereais, como cereais matinais, lanches finos de padaria, pão, massas e até mesmo em óleos comestíveis, tais como os óleos de milho e gérmen de trigo que são considerados uma das principais fontes de exposição humana a ZEN. Estudos indicaram que a ZEN foi um fator desencadeante para o desenvolvimento da puberdade precoce central (PPC) e foi classificado como cancerígeno do Grupo 3 pelo IARC o FDA não possui limites estabelecidos para ZEN. Mas a UE regulamentou que o nível de ZEN em alimentos para consumo humano deve ser inferior a faixa de 75 a 350  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , dependendo da categoria do alimento (WAN; CHEN; RAO, 2020).

A figura 13 mostra alguns sinais clínicos apresentados por determinadas espécies de animais e a taxa de sensibilidade que a espécie apresenta perante a contaminação por ZEN (PEGASUS SCIENCE, 2020).

**Figura 13 – Sinais clínicos advindos da contaminação por Zearalenona e a sensibilidade por espécie.**



Fonte: Adaptado de LTDA, 2020.

### 3.3 Métodos de análises para detecção de micotoxinas em alimentos

#### 3.3.1 Análise qualitativa e quantitativa

Segundo os estudos apresentados por Shanakhat *et al.* (2018), os métodos de análise de micotoxinas devem ser precisos, rápidos, simples, robustos e seletivos para permitir a determinação. O método analítico independente de ser qualitativo ou quantitativo deve ser selecionado de acordo com o objetivo da análise, quanto mais sensível for o método, melhor indicado ele será para detectar baixos níveis de tolerância em produtos alimentícios. As micotoxinas podem ser detectadas por diferentes técnicas cromatográficas ou métodos imunológicos, dentre as técnicas cromatográficas de análise, estão a HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência) associada à fluorescederivatização (FLD) e MS / MS (Espectrometria de massa), é o método mais popular para a detecção de micotoxinas em cereais. O uso da técnica de Cromatografia gasosa (GC) foi usada para a análise de micotoxinas, como ZEN, Fusarenon X, DON e derivados, na avaliação de várias matrizes alimentares, constitui-se de uma técnica conveniente, pois combina separação superior em colunas capilares com uma variedade de detectores gerais ou específicos, como o espectrômetro de massa (MS).

Uma separação bidimensional usando corte cardíaco Deans ou sistemas abrangentes também foram realizados, melhorando o poder de separação. Resumidamente, no corte cardíaco, uma parte da amostra da primeira coluna era transferida para uma segunda coluna através de uma interface como o switch Deans. Fez-se necessário uma fase de derivatização, como sililação e acilação, lembrando que a maioria das micotoxinas são caracterizadas por baixa volatilidade. No caso de métodos de detecção físico-químicos, estes exigem uma preparação mais demorada da amostra, portanto, os bioensaios se espalharam para a detecção de micotoxinas. Nesses métodos, o anticorpo específico para micotoxinas (em concentração fixa) é misturado a uma amostra contendo uma quantidade conhecida de micotoxina. Um complexo é formado e as respostas são geradas em uma faixa de concentrações padrão de micotoxinas, que são usadas para gerar uma curva de calibração e tabela e, finalmente, amostras desconhecidas são determinadas por referência à curva de calibração. Os avanços em pesquisas na área tornaram possível o desenvolvimento de testes baseados em anticorpos altamente específicos; e vários kits estão sendo comercializados, os mesmos ajudam a identificar e mensurar a concentração de micotoxinas em produtos alimentícios, o mais interessante é a rapidez da resposta muitas vezes com tempos inferiores a 10 minutos (SHANAKHAT *et al.* 2018).

Os autores Shanakhat *et al.* (2018), explanam que são bioensaios os quais o funcionamento é baseado nas afinidades de anticorpos monoclonais e policlonais, é a associação de três tipos diferentes de métodos imunoquímicos diferenciados: (1) radioimunoensaio (RIA); (2) ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA); e (3) ensaio de coluna de imunidade (ICA). ELISA é a técnica de imunoensaio mais difundida usada na análise OTA por sua simplicidade e capacidade de análise paralela de várias amostras. Foi descoberto que o método clássico de ELISA poderia ser aprimorado reduzindo o revestimento e o tempo de competição, com base no uso de nanopartículas superparamagnéticas. Mais recentemente, foi proposta uma nova abordagem para ELISA multiplex em modo cinético. A aplicação de estreptavidina-poliperoxidase e um anticorpo modificado por biotina foi combinada com a redução passo a passo da duração de cada estágio. Este ensaio permitiu o monitoramento e controle de micotoxinas AFB1, OTA e ZEN simultaneamente em um tempo total de 25 minutos.

Os métodos de bioensaio têm várias vantagens sobre outros métodos, como meios rápidos de triagem de amostra, sensibilidade, facilidade de operação, alto rendimento e resultados rápidos e confiáveis. Suas desvantagens são reatividade cruzada e dependência

de matriz. Essas técnicas incluem reflexo infravermelho próximo (NIR), espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia Raman, que podem fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre a estrutura das micotoxinas. Em contrapartida a tecnologia espectroscópica tem sido limitada devido à difícil interpretação de dados espectrais e sobreposição de espectros (SHANAKHAT *et al.*, 2018).

### 3.3.2 Amostragem

A amostragem visa obter uma fração significativa do insumo trabalhado, a fim de que essa parcela tenha as mesmas particularidades do todo de um determinado lote. Os métodos de amostragem selecionados são cruciais na obtenção de amostras representativas, devido à alta heterogeneidade de contaminação por micotoxinas. Diante da alta heterogeneidade da concentração de micotoxinas exigida nas amostras, os métodos tradicionais de amostragem não são bons o suficiente para a estimativa de micotoxinas em alimentos agrícolas. Para planejar um procedimento correto, a substância a ser testada, o método analítico, o número de repetições, o número de medições por cada repetição e o método de amostragem devem ser definidos, uma boa amostragem é de fundamental importância para se determinar as ações que deverão ser implementadas com lotes que possam estar contaminados por micotoxinas. Um critério geral é que toda a amostra primária seja moída e misturada para se obter a mesma concentração de toxina da amostra original, isso é fundamental em cereais crus, uma vez que algumas micotoxinas, como o DON, estão presentes principalmente no pericarpo do grão. A Comissão EC401 / 2006 28 estabeleceu métodos de amostragem e análise para controle oficial dos níveis de micotoxinas em alimentos. Esses critérios se fazem necessários para garantir que os laboratórios de controle usem métodos com desempenhos comparáveis (SHANAKHAT *et al.*, 2018).

### 3.3.3 Extração

De acordo com Yang *et al.* (2019) a etapa de preparação da amostra é fundamental, pois é o primeiro procedimento analítico pelo qual ela é submetida, posteriormente passa por uma limpeza para melhorar a sensibilidade e especificidade dos métodos de detecção. A maioria das micotoxinas são altamente solúveis em solventes

orgânicos, incluindo acetonitrila (ACN), metanol, acetona, acetato de etila e diclorometano, mas pouco solúvel em água, com exceção das fumonisinas e patulinas.

Também pode ser usada uma mistura de solvente orgânico e tampão ácido ou água na extração de micotoxinas. A adição de água proporciona uma maior penetração dos solventes orgânicos na matriz alimentar, e o solvente ácido auxilia quebrando as fortes ligações entre os analitos e outros componentes dos alimentos, como proteínas e açúcares, favorecendo para o da eficiência da extração. Recentemente, muitos métodos instrumentais de extração automatizada com solventes foram usados na análise de micotoxinas, como extração com fluido supercrítico, extração acelerada com solvente e extração assistida por microondas. Esses métodos possuem algumas vantagens, incluindo menor consumo de solvente químico e melhor eficiência de extração, mas os equipamentos necessários para a realização desses tipos de extrações tem custo elevado e não são fáceis de implantar no caso de laboratórios comuns, ou seja, o custo benefício precisa ser muito bem avaliado (HORKY *et al.*, 2020).

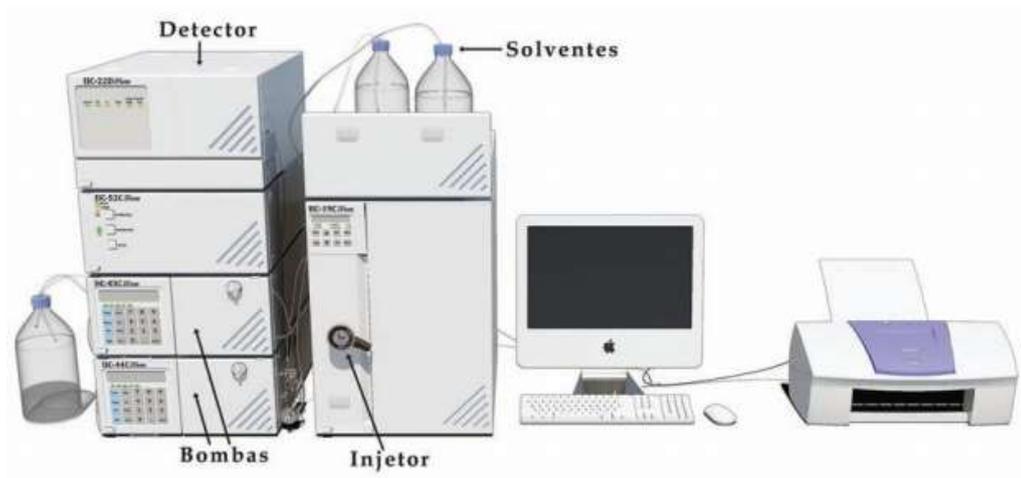
#### 3.3.4 Cromatografia Líquida

Segundo Horky *et al.* (2020), a cromatografia líquida (LC) apresentou avanços tecnológicos significativos, mas ainda tem muitos desafios a serem superados devido ao nível traço a ser detectado e ao efeito matriz. A maioria dos recursos cromatográficos dependem de equipamentos com tecnologia avançada e profissionais bem qualificados para manuseio e interpretação dos dados gerados, o que por sua vez agregam custos elevados não somente durante o período de implantação e manutenção do sistema e infelizmente isso não corresponde à realidade econômica de alguns países em desenvolvimento.

A técnica oferece a oportunidade de determinar simultaneamente várias micotoxinas, independentemente da sua estrutura química ou atividade biológica. A separação entre analitos e componentes da matriz é realizada por coluna analítica na qual passa uma fase móvel. Este método é aplicado para separação e determinação para micotoxinas de alta polaridade e não voláteis e termicamente instáveis. O sistema de detecção por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS), agrega alta sensibilidade e seletividade sem derivatização, este tipo de sistema é uma das metodologias mais aceitas com grande sucesso na análise de micotoxinas (HORKY *et al.*,

2020). A figura 14 mostra uma esquematização das principais partes de um cromatógrafo líquido - HPLC.

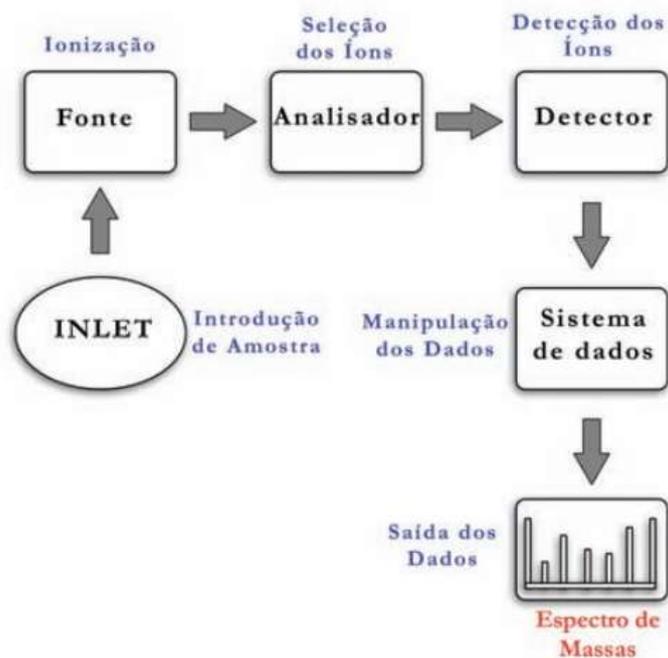
**Figura 14 – Esquematização de um cromatógrafo líquido.**



Fonte: CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA (LC) / ESPECTROMETRIA DE MASSAS, 2009.

A cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC / MS / MS) é uma ferramenta analítica que apresenta muitas vantagens sobre outras técnicas cromatográficas, como detecção seletiva e sensível, capacidade de gerar a informação estrutural do analito, baixos limites de detecção, requisitos mínimos para preparação da amostra, possibilidade de identificar a ampla faixa de analitos em polaridades diferentes e o uso de detectores gerais, que não dependem de características químicas. A espectrometria de massa é capaz de separar fragmentos de massa até a quarta ou quinta casa decimal (massa exata), onde a instrumentação anterior era limitada a unidades de massa de um dígito (massa inteira). A introdução da espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) oferece a possibilidade de analisar vários contaminantes com uma única extração, incluindo alcalóides da cravagem, pesticidas e medicamentos veterinários (SHANAKHAT *et al.*, 2018). A figura 15 mostra as principais partes de um espectrômetro de massas.

**Figura 15 – Esquematização de um espectrômetro de massas.**

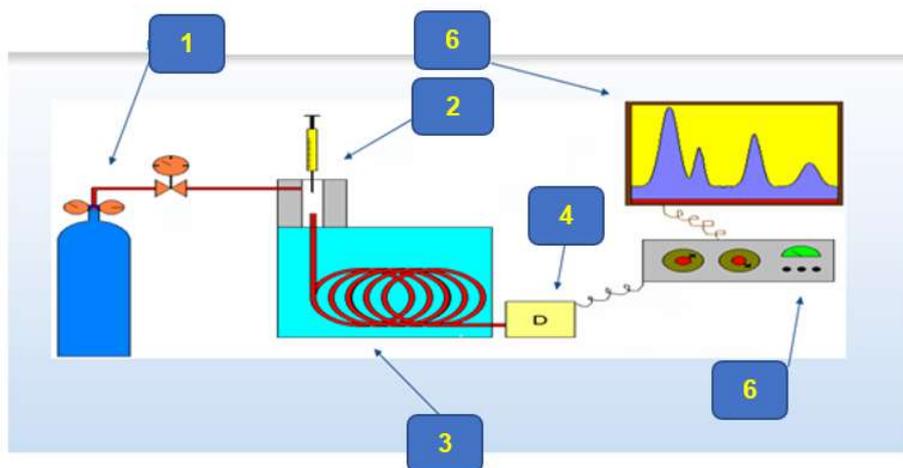


Fonte: CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC) / ESPECTROMETRIA DE MASSAS, 2009.

### 3.3.5 Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa (CG) é uma ferramenta raramente explorada na detecção e quantificação de micotoxinas, pois a maior parte das micotoxinas são substâncias não voláteis e polares, e uma etapa da CG conhecida como derivatização ocorre conversão em derivados voláteis e as micotoxinas não se encaixam nesse perfil analítico, pois isso é realizado pela sililação ou acilação. A figura 16 exemplifica uma o funcionamento de um cromatógrafo gasoso através de um diagrama. Dentre os detectores de capturas de elétrons (ECD), ionização de chama (FID) o detector espectrometria de massa única (MS) é o mais utilizado em cromatografia gasosa (AGRIOPOULOU; STAMATELOPOULOU; VARZAKAS, 2020).

**Figura 16 – Diagrama do funcionamento do cromatógrafo gasoso.**



1 – Reservatório de gás e controles de vazão/pressão; 2 – Injetor (vaporizador) de amostra; 3 – Coluna cromatográfica e forno da coluna; 4 – Detector; 5 – Eletrônica de tratamento (Amplificação) de sinal e 6 – Registro de sinal (computador).

Fonte: MARCELO DEL GRANDE, 2021.

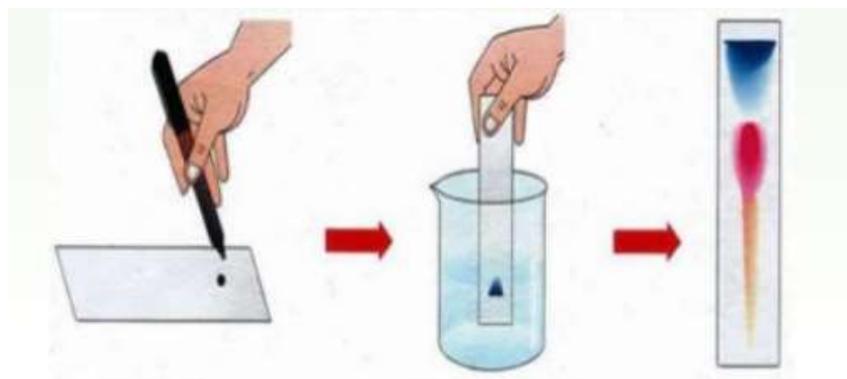
Yang *et al.* (2019), relata que as análises cromatográficas possuem simplicidade, portabilidade, sensibilidade e seletividade satisfatórias e custo relativamente mais baixo. Embora existam muitas vantagens da tecnologia relacionada a Cromatografia Gasosa - GC, seu uso em análises de micotoxinas não é difundido por causa da etapa de derivatização necessária, que muitas vezes encontra problemas de degradação.

### 3.3.6 Cromatografia em Camada Fina

A cromatografia em camada fina (TLC), conforme ilustra a figura 17, é a técnica mais antiga na determinação de micotoxinas juntamente com a cromatografia líquida de alta eficiência em combinação com variados detectores (exemplos: fluorescência, matriz de diodos, UV), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) dentre outros. A figura 18 expõem mais detalhes da técnica TLC, onde pode-se observar cubas cromatográficas com placas em eluição e a separação dos analitos em análise. O método que tem sido mais utilizado é o LC-MS e pode nos surpreender ainda mais, pois tem tido avanços tecnológicos e pesquisas contribuindo para que sejam identificadas simultaneamente múltiplas micotoxinas. É importante ressaltar que nos últimos anos esse

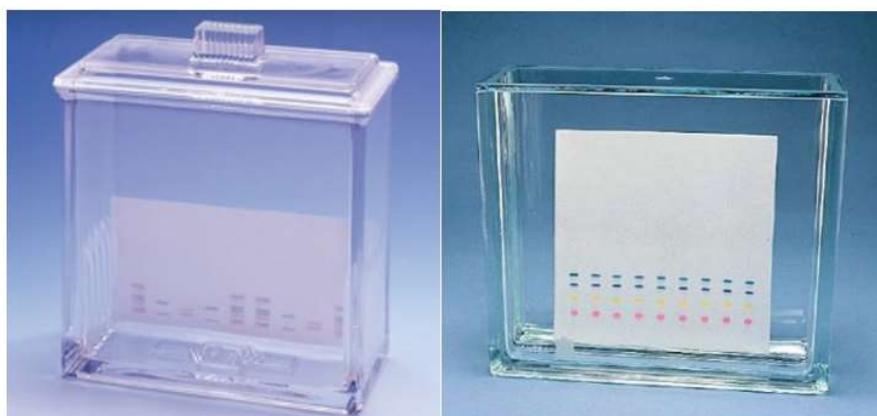
método tem tido uma atenção especial por parte dos pesquisadores (AGRIOPOULOU; STAMATELOPOULOU; VARZAKAS, 2020).

**Figura 17 – Esquema do princípio básico da técnica.**



Fonte: ALMEIDA *et al.*, 2013.

**Figura 18 – Cuba cromatográfica com placa em eluição e pós-eluição.**



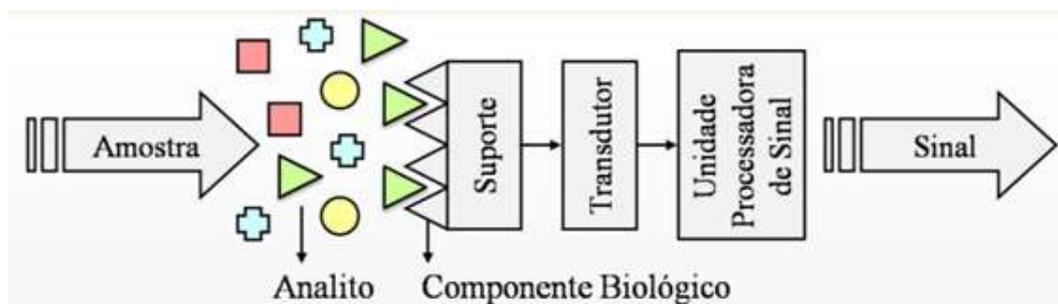
Fonte: RYE, 2021.

### 3.3.7 Biossensores

Segundo Yang *et al.* (2019), os sensores podem ser classificados em modelos ópticos e eletroquímicos de acordo com o princípio de transdução de sinal, exemplificado na figura 19. Biossensores de fluorescência são construídos principalmente com base no alvo analítico, resumidamente baseiam-se no aumento da fluorescência ou extinção da mesma, é amplamente utilizado na detecção de micotoxinas. Além disso, os biossensores

colorimétricos, apresentam fácil interpretação de leitura e rápida detecção visual a olho nu, seus equipamentos possuem baixo custo e podem ser facilmente transportados, pois são portáteis. O sensor de espalhamento Raman com superfície aprimorada também foi desenvolvido para a determinação de micotoxinas. Embora os sensores acima exibam muitos méritos, a detecção precisa de micotoxinas está repleta de enormes desafios devido ao nível de traços de analitos alvo e à complexa matriz alimentar. Além disso, a maioria dos sensores relatados revelaram tipos limitados de micotoxinas, e o surgimento de múltiplas micotoxinas em alimentos também traz um grande desafio para o ensaio de segurança alimentar usando tecnologias de sensores.

**Figura 19 – Esquema da organização dos componentes de um Biossensor.**



Fonte: OLIVEIRA; PEREIRA, 2016.

O uso de biossensores na indústria de alimentos para determinar micotoxinas contribuem fornecendo benefícios significativos, como agilidade nas análises, facilidade, redução de custos, reprodutibilidade, estabilidade e precisão. Os transdutores utilizados são ópticos (ressonância plasmon de superfície - SPR e fluorescência), piezoelétricos (microbalança de cristal de quartzo - QCM) e eletroquímicos (impedimétrico, potenciométrico e amperométrico). Como elementos de reconhecimento comuns temos peptídeos, enzimas, anticorpos, células, ácidos nucleicos, e outros materiais, como aptâmeros, polímeros impressos molecularmente e anticorpos recombinantes. Nanopartículas de metal, nanotubos de carbono e nanofibras também foram testados para melhorar a sensibilidade do biossensor. São materiais biocompatíveis e caracterizados por características físico-químicas especiais, como alta relação superfície-volume. A tabela 1 a seguir especifica algumas vantagens e limitações dos biossensores mais usados no mercado (AGRIOPOULOU; STAMATELOPOULOU; VARZAKAS, 2020).

**Tabela 1 - Vantagens X limitações dos biossensores na detecção de micotoxinas**

<b>Biossensores</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>
<b>Impedimétrico</b>	Alta sensibilidade, seletividade, resposta rápida, mobilidade (portátil) e de fácil operação.	Marcadores caros e construção complexa.
<b>Plasmon de superfície ressonância</b>	Resposta rápida, alta sensibilidade e especificidade, custo reduzido e mobilidade (portátil).	Manuseio e aplicação prática ainda em desenvolvimento.
<b>Amperométrico</b>	Mobilidade (portátil), alta sensibilidade e seletividade.	Regeneração entre medidas.
<b>Potenciométrico</b>	Redução no tempo de análise, mobilidade (portátil), alta sensibilidade e seletividade.	Fatores como temperatura, pressão, pH, reação suporte de imobilização e imunológica cruzada influenciam fortemente a sensibilidade do método.
<b>Microbalança Cristal de quartzo</b>	Baixo custo, alta seletividade e sensibilidade, sem radiação e desenvolvimento de dispositivos portáteis.	Em caso de ensaios de sinalização é necessário um sinal relativamente alto.

Fonte: AGRIOPOULOU; STAMATELOPOULOU; VARZAKAS, 2020.

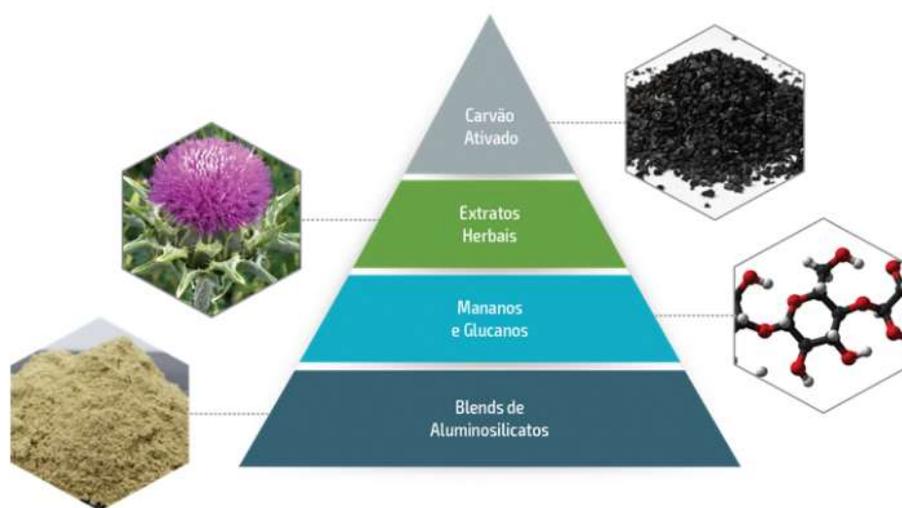
### 3.3.8 Adsorventes de Micotoxinas

Segundo com Lidson Nery (2020), a contaminação dos grãos pode ocorrer antes do armazenamento, no transporte ou ainda no plantio. Isso indica que todas as medidas para controle do crescimento fúngico são de extrema importância pois evitam perdas e prejuízo econômico além de preservar a saúde humana e animal. A partir do momento

que houve contaminação por parte das micotoxinas, e o consumo do grão ou produto acabado contaminado deve ser imediatamente isolado, seja para alimentação humana ou animal. Daí em diante pode-se seguir dois caminhos a serem seguidos: Proceder com a descontaminação ou utilizar os adsorventes de micotoxinas, no comércio podem ser encontrados algumas variações de adsorventes com aplicações em diversas áreas (figura 20). O mercado oferece várias opções de adsorventes de micotoxinas com diversas composições, isso exige conhecimento sobre a eficácia de cada um desses produtos sobre o tipo de micotoxina a qual ele irá atuar para evitar perdas prejuízos financeiros.

Os mais acessíveis levando-se em consideração o custo são os adsorventes de compostos por aluminossilicatos e argilas classificados como inorgânicos, tem eficiência comprovada atuando em micotoxinas polares. Os adsorventes minerais sequestram a molécula da micotoxinas por meio de trocas de cargas, mais conhecida por troca catiônica. Os adsorventes são considerados uma boa alternativa, o tratamento com o mesmo está condicionado ao seu custo que pode se tornar inviável (LIDSON NERY, 2020).

**Figura 20 – Matérias-primas dos adsorventes de micotoxinas disponíveis no mercado.**



Fonte: LIDSON NERY, 2020.

Os relatos de Luo *et al.* (2019), mostram que as ligações químicas entre micotoxinas e leveduras / bactérias foram identificadas por detecção direta ou ensaios de

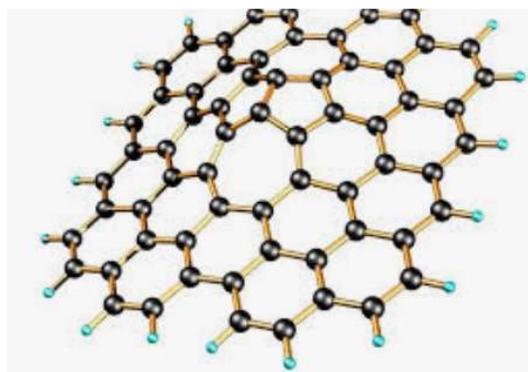
especulação indireta. A estrutura 3D da parede celular da levedura desempenhou um papel importante na adsorção, e vários estudos identificaram a interação entre bactérias do ácido lático e micotoxinas através de ensaios de especulação indireta. Embora algumas ligações químicas e tipos de forças de interação tenham sido identificados aqui, ainda é necessário bastante estudo para determinar precisamente o mecanismo de ligação entre leveduras / bactérias e micotoxina.

Diante do que foi estudado até então pode-se resumir da seguinte forma: Primeiro, a adsorção de micotoxinas por leveduras / bactérias é determinada e autorregulada pelas estruturas e composições de suas paredes celulares. Além disso, suas composições de parede e estruturas tridimensionais podem ser alteradas por meio da regulação gênica. Em seguida, as forças de interação entre elas foram identificadas como interações hidrofóbicas e eletrostáticas com fracas interações de hidrogênio e van der Waals. Mas como já mencionado, pesquisas mais aprofundadas devem continuar sendo realizadas, para atualizar de forma mais precisa o conhecimento dos mecanismos que envolvem a adsorção de micotoxinas (LUO *et al.*, 2019).

### 3.3.9 Óxido de Grafeno – GO

Segundo Palazzesi (2008) o óxido de grafeno é derivado da oxidação do grafite, estruturalmente é composto por lâminas finíssimas sobrepostas dispostas na forma de hexágonos (figura 21), permitindo que o óxido de grafeno suporte um peso considerável e seja extremamente flexível.

**Figura 21 – Representação tridimensional da estrutura molecular do óxido de grafeno.**



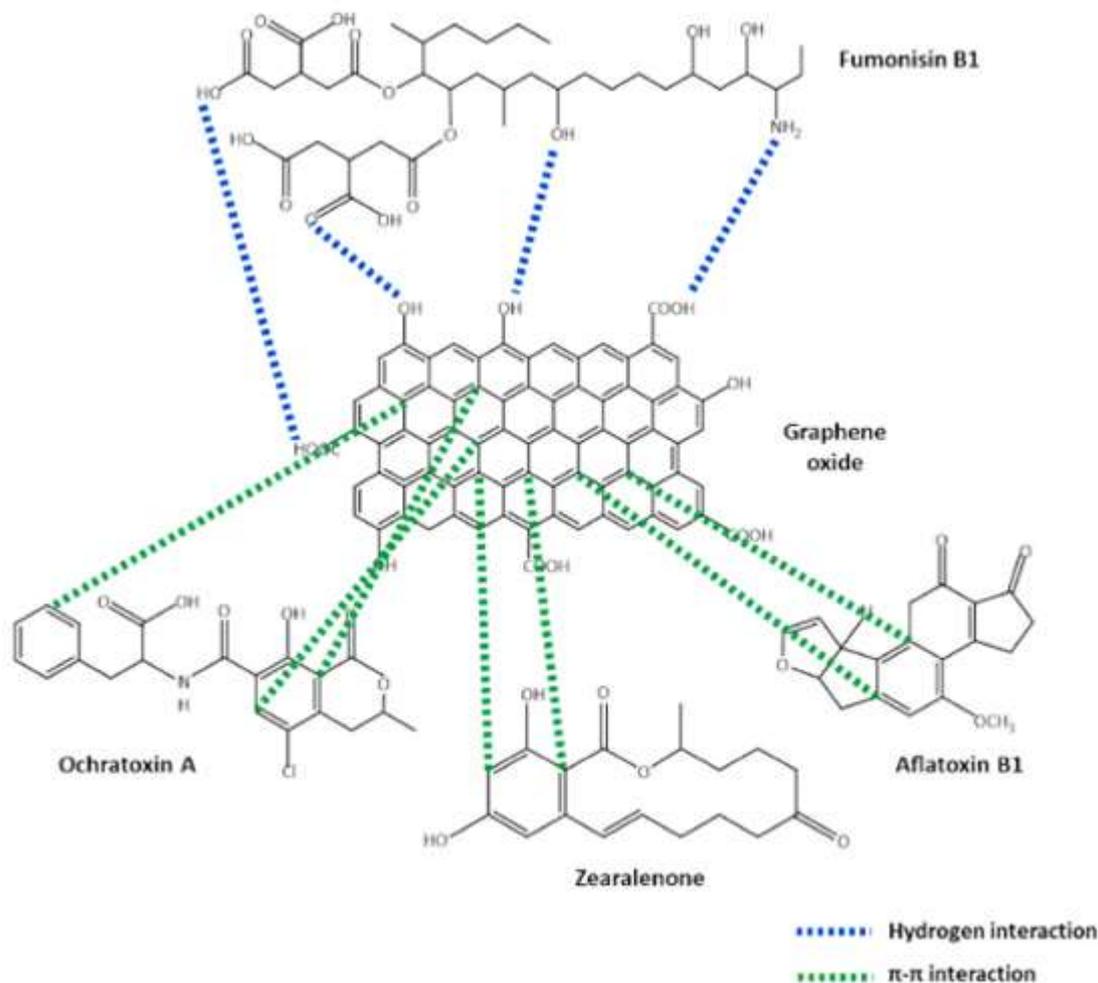
Fonte: PALAZZESI, 2008.

### 3.3.9.1 Algumas particularidades do óxido de grafeno e seu potencial de interação com moléculas específicas

De acordo com Bytesnikova, Adam e Richtera (2021) a primeira vez que o óxido de grafeno com adição em outros materiais foi em 1960. Desde então, o material passou por algumas modificações quanto a forma de utilização. Mas resumidamente GO é um derivado de grafite, a preparação consiste em dois processos, esfoliação e oxidação, é um nanomaterial à base de carbono com propriedades exclusivas tais como um plano basal e bordas enriquecidas com variados grupos funcionais ricos em oxigênio: hidroxila, carboxila, carbonila, e grupos epóxido. O GO possui uma estrutura composta por uma camada de átomos de carbono com a espessura de um átomo dobrada em uma estrutura em favo de mel, pode sequestrar várias substâncias como estrôncio, arsênio, selênio, e metais pesados (Pb, Hg, Cd) retardadores de chama, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, óxido de carbono (CO), corantes orgânicos, produtos químicos desreguladores endócrinos, antibióticos (ATB) e nosso foco principal que são as micotoxinas.

O GO pode ser utilizado como adsorvente de outras maneiras, mas a maioria das pesquisas tem estudado sua eficácia em soluções aquosas, isso graças aos grupos funcionais ricos em oxigênio presentes em sua estrutura, os quais interagem hidrofílicamente com a água. Outra vantagem dessa hidrofília do óxido de grafeno, é a capacidade de adsorver com notável eficiência a umidade atmosférica. Os grupos aromáticos permanecem na estrutura do composto favorecendo possíveis interações que possam ocorrer, preferencialmente entre outras estruturas também aromáticas as quais podem ser adsorvidas no GO por ligações  $\pi - \pi$  empilhamento. O plano basal das folhas presentes na estrutura do GO pode ligar micotoxinas com seu anel aromático e bordas, e os defeitos podem ligar micotoxinas por interações de hidrogênio, como sugerido na figura 20. Outro aspecto vantajoso é que o óxido de grafeno pode ser facilmente restabelecido em metanol e pode ser perfeitamente reutilizado sem perda de eficiência (BYTESNIKOVA; ADAM; RICHTERA, 2021).

**Figura 22 – Possibilidades de interações com variadas moléculas de micotoxinas devido aos anéis aromáticos presentes em sua estrutura e determinados grupos funcionais.**



Fonte: BYTESNIKOVA; ADAM; RICHTERA, 2021.

Horky *et al.* (2020) argumenta, que uma desvantagem dos adsorventes é a adsorção inespecífica, ou seja, nutrientes essenciais podem ser adsorvidos se suas concentrações no analito forem muito maiores em comparação com as da micotoxina.

A eficácia do óxido de grafeno como adsorvente é influenciada por fatores como pH, composição e força iônica do ambiente, mas também por reações intramoleculares que incluem efeitos estéricos. Portanto, é essencial compreender esses fenômenos *in vitro* e, posteriormente, monitorá-los *in vivo*. Diante dos vários tipos de ligantes observados na revisão literária, entre os ligantes à base de argila, carvão ativado ou paredes de levedura, o óxido de grafeno possui uma capacidade de adsorção promissora, com possibilidade de

modificação e funcionalização para micotoxinas. Usar da escala de nanoestrutura do óxido de grafeno, pois possui maior interação devido ao aumento da área superficial além de outras vantagens intrínsecas do material (SHOALA, 2020).

### 3.3.9.2 Nanocompósitos a base de GO

Como nada é perfeito apesar de suas excelentes propriedades, sua aplicação é complicada devido a sua difícil separação. Não é possível separar as micotoxinas do óxido de grafeno utilizando sedimentação e filtração, uma maneira eficiente é a aplicação de nanopartículas magnéticas, é uma eficiente ferramenta na remoção de vários contaminantes, tais como gases tóxicos e compostos orgânicos e inorgânicos tóxicos. A combinação de GO com nanopartículas magnéticas apresenta vantagem, pois o campo magnético periférico pode acelerar a adsorção e requer menos energia em quando comparados a outros métodos. O preço da produção de partículas magnéticas de óxido de grafeno (MGO) é uma vantagem não desprezível que pode aumentar seu potencial de aplicação na indústria. A ligação de micotoxinas a MGO é mediada por grupos hidroxila e íons ferro ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ). Foram sugeridas duas formas de reduzir as micotoxinas por meio de nanocompósitos MGO, o primeiro mecanismo inclui as interações  $\pi - \pi$  empilhamento não covalentes entre o plano basal do GO e os anéis aromáticos das micotoxinas, que são iguais aos do próprio GO. O segundo mecanismo inclui a atração eletrostática entre íons ferro carregados positivamente ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) de MGO e analitos com carga negativa ( $\text{COO}^-$ ), atuam acelerando a transferência de elétrons. O sistema o  $\beta$ -sistema dicarbonil da aflatoxina pode ser coordenado por cátions férricos e ferrosos através de interações eletrostáticas, atribuindo alta capacidade de absorvância do nanocompósito. A MGO possui grupos funcionais para enxertar polímeros, um exemplo é a inserção de quitosana para melhorar a capacidade de adsorção. A quitosana, em especialmente poli [ $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) -2-amino-2-- desoxi D- glucopiranosose], é um polissacarídeo linear obtido pela N-desacetilação alcalina da quitina, que é o segundo biopolímero mais abundante no planeta. Possui muitas vantagens tais como biocompatibilidade, hidrofiliabilidade e eficácia, possibilitando variadas aplicações deste produto em escala industrial. Os grupos amino e carbonila presentes na composição da quitosana favorecem o aumento da sua capacidade de adsorção, pois esses grupos funcionais funcionam como um ponto de ligação para poluentes e toxinas em ambientes

com pH baixo, visto que a quitosana tem ação limitada em ambientes ácidos. No entanto, tais grupos funcionais favorecem a reticulação da quitosana produzindo uma resistência superior em ambientes ácidos e proporcionando o aumento da capacidade de adsorção da quitosana e do seu potencial de aplicação. Na tabela 2, fica claro que o GO e seus compostos apresentam boa eficiência de adsorção, além de apresentarem atividade para um variado número de micotoxinas com estruturas químicas distintas. Outro ponto positivo é que a eficácia do GO e seus compósitos, não é limitado pelo tipo de alimento ou ração, que geralmente são substâncias com estruturas complexas e complicadas (BYTESNIKOVA; ADAM; RICHTERA, 2021).

**Tabela 2 - GO e seus compostos e a eficiência na adsorção de diversas micotoxinas de alimentos e rações.**

Material	Condições	Substrato para micotoxinas	Micotoxinas	Eficiência (relativa recuperação)	Limite de detecção	Limite de quantificação
MGO-CTS	pH 5 50 - C 30 mg de adsorvente	Padrões analíticos	AFB <sub>1</sub> OTA <sub>1</sub> ZEN	3,85 ng / g 3,19 ng / g 3,33 ng / g	-	-
MGO	6,2 40,6 - C 5,2 h 200 mg de adsorvente	Bolo de palmiste (alimentação animal)	VESTI <sub>1</sub> ZEN T-2 HT-2	69,57% 67,28% 37,17% 57,40%	-	-
VAI	de GO 10 min 5 mg de adsorvente	Amandóim	AFB <sub>1</sub> AFB <sub>2</sub> AFG <sub>1</sub> AFG <sub>2</sub>	87,4 - 92,8% 92,9 - 94,9% 89,5 - 100,8% 85,1 - 96,5%	0,08 - 0,85 ng / g	0,25 - 2,00 ng / g
GO (massa revestido barra)	40 min 400 rpm Sem NaCl	Leite de soja	AFB <sub>1</sub> AFB <sub>2</sub> AFG <sub>1</sub> AFG <sub>2</sub>	91,0 - 101,4% 92,0 - 97,3% 80,5 - 94,6% 84,5 - 100,8%	2,4 - 8,0 pg / mL	-
MGO	20 mg de adsorvente de NaCl Sem ajuste de pH Extração de fase sólida	Pão	AFB <sub>1</sub> AFB <sub>2</sub> AFG <sub>1</sub> AFG <sub>2</sub>	59 ± 2% 63 - 3% 66 ± 1% 69 ± 2%	0,06 - 0,10 μg / kg	0,20 - 0,33 μg / kg
β- CD poroso grafeno	15 mg de adsorvente Sem ajuste de pH Extração de fase sólida	Milho, Ração à base de cereais	AFB <sub>1</sub> AFB <sub>2</sub> AFG <sub>1</sub> AFG <sub>2</sub>	90,5 - 105% 90,5 - 105% 90,5 - 105% 90,5 - 105%	0,0075 - 0,0300 μg / kg	0,025 - 0,100 μg / kg
3D-GO Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	30 mg de adsorvente 10% do valor de pH ótimo de NaCl 5 - 7 Extração de fase sólida	Soja e soja- comida baseada	AFB <sub>1</sub> AFB <sub>2</sub> AFG <sub>1</sub> AFG <sub>2</sub>	83 - 103% 83 - 103% 83 - 103% 83 - 103%	0,09 - 0,15 μg / kg	0,30 - 0,50 μg / kg
Silica / GO	100 mg de adsorvente 10 min de tempo de interação Extração de fase sólida	Milho, arroz	AFB <sub>1</sub> AFB <sub>2</sub> AFG <sub>1</sub> AFG <sub>2</sub>	78,8 - 106,9% 78,8 - 106,9% 78,8 - 106,9% 78,8 - 106,9%	0,1 - 0,3 μg / kg	0,3 - 1,0 μg / kg

Fonte: BYTESNIKOVA; ADAM; RICHTERA, 2021.

#### **4 ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS DE ANÁLISE APRESENTADOS, INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS E INSERÇÃO DE NOVOS MATERIAIS PRESENTES NO MERCADO PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS**

Qualificar e quantificar micotoxinas constitui-se um verdadeiro obstáculo levando-se em consideração as peculiaridades de cada grupamento ligado a famílias químicas distintas, ocorrem de forma aleatória e coexistente nos alimentos e em ínfimas quantidades, mais conhecidas como quantidades traços. A multiplicidade dos componentes químicos com variados graus de toxicidades dentro de uma mesma classe espécie, e abundantes localizações em posições diferenciadas de estruturas celulares, e assim por diante. O conhecimento sobre as micotoxinas em alimentos foi favorecido pelo avanço tecnológico das técnicas cromatográficas.

Ambas às técnicas apresentadas ao longo do estudo em questão possuem alta resolução e são extremamente confiáveis, por isso são amplamente empregadas na detecção e separação de analitos que se estão contidos em pequenas concentrações em determinadas matrizes. A utilização de tais técnicas tem sido cada vez mais aplicadas na toxicologia, quer seja para o monitoramento de drogas ilícitas ou em apoio a esclarecimento de crimes, muito úteis na identificação e quantificação de algumas substâncias. No caso dos alimentos não é diferente, as técnicas cromatográficas e biossensores auxiliam na detecção e controle das micotoxinas, discutidas no decorrer desta pesquisa, elas são metabólitos altamente prejudiciais à saúde humana e animal o que classifica tal monitoramento como essencial para garantia e preservação da saúde.

Furlong (2015) destaca que houve um ganho em possibilidades do controle das micotoxinas e dos fenômenos relacionados, as demandas aumentam, principalmente em relação aos materiais para preparação das amostras, pureza de padrões e reagentes, padrões certificados e capacitação de analistas. Mas tudo tem consequência, e os avanços tecnológicos culminam em elevação de custos, especialmente em países que precisam importar equipamentos e insumos. Outro pormenor, é que os resultados gerados em condições menos sofisticadas, são questionados pela comunidade científica ou pelos órgãos de fiscalização. Diante de um cenário não favorável financeiramente, muitos setores públicos e privados se encontram em circunstâncias impraticáveis de gerar dados analíticos sobre a situação micotoxicológica dos alimentos, o que dificulta tomar ações para controlar a disseminação das micotoxinas, e capacitar profissionais que tenham

sólida compreensão das técnicas de separação e os cuidados que devem ser tomados para garantir a confiabilidade dos resultados.

Iniciando os comentários pela Cromatografia em camada Fina ou camada delgada, poderíamos implantá-la em locais onde a realidade econômica não é favorável, pois em comparação com as outras técnicas cromatográficas abordadas, essa tem um menor custo, mas seria apenas um paliativo considerando que as técnicas HPLC e CG, possuem uma confiabilidade maior. O que não exclui totalmente a cromatografia em camada fina, desde que seja construída uma curva de calibração eficiente, ou seja com padrões analíticos de qualidade e suas concentrações sejam rigorosamente conhecidas e utilizem de outra metodologia para confirmação do laudo analítico gerado. Ressaltando que as micotoxinas representam risco para a saúde pública, tomar providências é fundamental, mas qualquer decisão a ser tomada fica restrita pelo impasse de dispor de informações seguras geradas com recursos analíticos inferiores quanto ao quesito sofisticação, ou considerar apenas os resultados produzidos sob condições operacionais que disponham de recursos tecnológicos mais avançados.

Nossas considerações estão amparadas pelas concepções de Goulart (2012), pois em sua pesquisa ele frisa sobre a simplicidade da técnica, rapidez e economia que ela agrega. Após o processo de aplicação e secagem da placa o autor explana que é perfeitamente possível realizar uma boa revelação da placa trabalhada com reativos adequados identificando os analitos de interesse.

Os cálculos são simplificados para essa técnica, onde o parâmetro mais importante é o fator de retenção ( $R_f$ ), que é mensurado obtendo-se a razão entre as distâncias percorrida pelo analito e pela fase móvel, conforme a Equação 1. O resultado encontrado é que irá determinar se a substância encontrada se refere ou não ao padrão de análise.

$$R_f = \frac{\Delta S \text{ Mancha}}{\Delta S \text{ solvente}} \quad (1)$$

**Termos da Equação:**

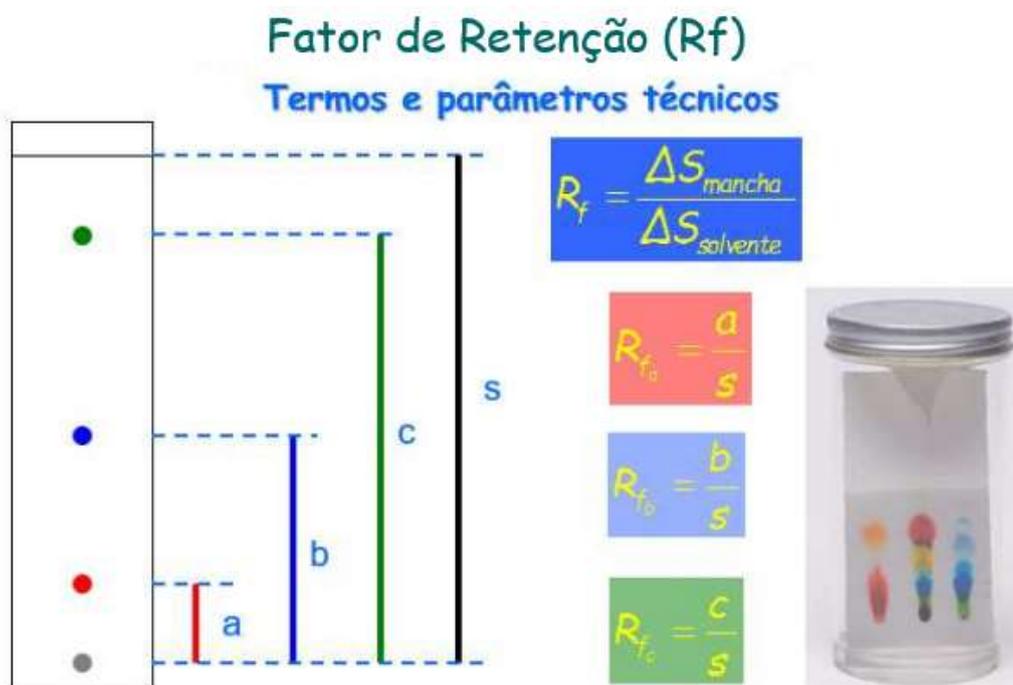
$R_f$  – Fator de retenção;

$\Delta S \text{ Mancha}$  – Distância percorrida pela mancha gerada pelo analito aplicado na placa; e

$\Delta S \text{ Solvente}$  – Distância percorrida pelo solvente.

A figura 21 ilustra com mais detalhes como identificar a distância do analito principal, dos elementos presentes em sua composição e do solvente responsável por carregá-los no caminho a ser percorrido.

**Figura 23 – Demonstração de como retirar os dados necessários para o cálculo do Rf de uma amostra aplicada e dos componentes que constituem sua composição**



Ponto de aplicação da amostra

**a - Primeira substância da composição a ser separada;**

**b - Segunda substância da composição a ser separada;**

**c - Terceira substância da composição a ser separada, e**

**s - Distância total percorrida pelo solvente.**

Fonte: Adaptado de BERTOLINI, [2000] data correta não indicada na publicação.

Para interpretação dos dados gerados por essa técnica deve ser levado em consideração que o Fator de retenção, precisa ser sempre  $< 1$ . Os valores encontrados no cálculo do Rf podem oscilar, pois são dependentes das condições experimentais tais como: solvente utilizado, temperatura, concentração, saturação da câmara cromatográfica dentre outros. Compostos que apresentem o mesmo valor de Rf podem ser considerados idênticos; o contrário também é verdadeiro, pois nos permite avaliar se o analito em estudo encontra-se puro ou não, caso emita uma única mancha, o composto é classificado puro, se expressar mais manchas se trata de composto misto. Essa seria uma certa desvantagem da técnica, pois para confirmar qual o composto está contido no analito, seriam necessárias mais etapas de análise, que se forem realizadas via cromatografia em

camada fina pode levar um tempo excessivo e no caso de micotoxinas essa não é a melhor estratégia a ser seguida.

Furlong (2015) respalda os argumentos expostos ao citar que na década de 90 a técnica de cromatografia em camada fina era profusamente indicada por órgãos oficiais como ferramenta de avaliação da ocorrência de corantes sintéticos, carotenoides, açúcares, aminoácidos, grupos de metais e micotoxinas em alimentos. No caso dos compostos com ausência de cor ou sem fluorescência, caso fossem revelados eram necessárias etapas de derivação (reações químicas) que os tornasse coloridos, fluorescentes para visualização, determinação densitométrica ou imagem fotométrica para confirmação da linhagem presente. Um agravante da técnica é que seus resultados são considerados semiquantitativos, devido a variabilidade dos resultados que pode ser superior a 20% e os limites de detecção promoverem resultados falsos negativos.

Em aspectos gerais, apesar de ser uma técnica básica, ela pode ser aplicada para uma ampla classe de amostras e trabalhada em pequenas quantidades. Os custos são razoáveis e a separação pode ser obtida em um tempo relativamente curto, mas nada comparado aos resultados que pequenas colunas de HPLC podem proporcionar. A desvantagem é que apesar de ser possível a quantificação por essa metodologia, isso implica em investimentos mais altos, visto que o preço dos padrões analíticos que possibilitam essa quantificação são demasiadamente caro.

Traçando um comparativo entre a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa, ambas são bastante eficientes, altamente seletivas e com ampla aplicação, trabalham com poucas quantidades de amostras e quantificam prontamente o material processado, além de serem facilmente acoplados ao espectrômetro de massas. O autor Silva (2014) em seu trabalho concorda com nossas explicações a respeito das técnicas. Inclusive, seu ponto de vista relativo as vantagens de cada uma delas, está explícito conforme a Tabela 3.

**Tabela 3 – Vantagens apresentadas pelas técnicas cromatográficas, HPLC e CG.**

<b>Cromatografia Líquida - HPLC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Capacidade de separar compostos não-voláteis e termicamente instáveis</li> <li>- Aplicada para determinação de íons inorgânicos</li> </ul>
<b>Cromatografia Gasosa – CG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Equipamento menos sofisticado, logo menor custo quando comparado ao HPLC</li> <li>- Rápido</li> <li>- Maior resolução, com colunas capilares</li> </ul>

Fonte: Adaptado de SILVA, 2014.

Para exemplificar os custos que ambas as técnicas podem gerar em sua implantação inicial, situa-se na Tabela 4 a precificação de equipamentos e alguns acessórios básicos os quais são indispensáveis para o seu funcionamento das técnicas listadas. Ressaltamos que os itens mencionados são apenas para fazer um comparativo em questão de valores, pois essa pequena listagem está muito longe de ser considerada como referência para implantação das técnicas mencionadas.

**Tabela 4 – Levantamento de preços de cromatógrafos Líquido e gasoso e alguns de seus acessórios.**

<b>Cromatografia Líquida - HPLC</b>	
<b>Equipamento</b>	<b>Preço (R\$)</b>
Cromatógrafo Líquido	86.755,50
Coluna Cromatográfica Quiral	8.000,00
Coluna Cromatográfica C18	2.100,00
Cromatógrafo Líquido com detector UV-VIS (Ultra violeta visível)	109.890,30
<b>Cromatografia Gasosa - CG</b>	
Cromatógrafo Gasoso	31 174,15
Coluna empacotada em Inox	1.300,00
Coluna capilar	1.250,00

Fonte: Adaptado de MERCADO LIVRE, 2021 e ALIBABA, 2021.

Ambos os equipamentos são eficientes, e podem satisfazer os requisitos analíticos ao qual estamos avaliando, detectar micotoxinas, desde que os métodos adotados sejam perfeitamente validados, é o quesito que garante a confiabilidade dos resultados gerados.

De acordo com as argumentações de Oliveira e Pereira (2016) os biossensores podem contribuir com grandes avanços no controle de qualidade dos alimentos, o que promove maior garantia ao controle e segurança dos alimentos destinados ao consumo humano. Apresentam propriedades proficientes quando comparadas às técnicas de análise convencionais, como alta seletividade e sensibilidade, baixo custo, sem necessidade de alto investimento em capacitação em mão de obra especializada, o tempo de resposta é custo e dispensa tratamento prévio do analito.

Particularmente classificamos os biossensores como uma promissora alternativa que futuramente pode substituir os equipamentos cromatográficos, o que representa uma grande economia pois sua implantação e manutenção são muito mais acessíveis relativo a investimento financeiro e em mão de obra capacitada. É preciso consolidar as pesquisas

relacionadas a detecção de micotoxinas via biossensores, mas diante dos resultados publicados até a presente data, esta realidade pode estar mais próxima do que imaginamos.

A interação do eletrodo com a amostra, constitui-se um dos principais problemas desta técnica, induzem a perda ou irreprodutibilidade das medições. Este fato, categoriza a área do desenvolvimento de sensores como um grande campo a ser investigado, pois as possibilidades de aplicação que estes podem oferecer à indústria de alimentos são intensamente propícias (OLIVEIRA; PEREIRA, 2016).

## 5 IMPACTOS ECONÔMICOS RELACIONADOS ÀS MICOTOXINAS

Variadas culturas tem sido alvo das micotoxinas, em especial milho, trigo amendoim e outras nozes, algodão e café. De acordo com a FAO-ONU (Food and Agriculture Organization of the United Nations), órgãos das Nações Unidas que responde pela agricultura, estima-se que 25% das culturas mundiais são afetadas por micotoxinas anualmente, e os prejuízos chegam a 1 bilhão de toneladas de alimentos e seus derivados perdidos a cada ano. Conseqüentemente ocorrem impactos negativos na economia os motivos são devido:

- 1) rendimento abaixo do esperado por causa de contaminação por parte de micotoxinas;
- 2) menor preço de mercado pago pelas culturas devido ameaça de contaminação do produto comercializado;
- 3) redução da produtividade animal causados por problemas de saúde associados a micotoxicoses;
- 4) custos relacionados com a preservação da saúde humana. Além disso como já citado ao longo deste estudo, custos com manutenção, prevenção, amostragem, controle dos fungos e pesquisa para contenção do mesmo não são nada baratos. Isso afeta a economia de setores variados, vai desde agricultores, produtores de rações, pecuaristas, dono de celeiros e armazéns, indústrias processadoras de grãos até chegar na sociedade que arca com boa parte desses prejuízos (APS, 2021).

Segundo APS (2021), os custos das micotoxinas nos Estados Unidos são bem divergentes e podem girar entre \$0,5 a \$1,5 bilhões/ano, a segunda estimativa é de cerca de \$5 bilhões/ano para Estados Unidos e Canadá, ambos os cálculos estimados não levaram em consideração os impactos na saúde e os prejuízos agrícolas. Isolando o caso de Aflatoxinas em milho, somente nos EUA o impacto econômico é de \$225 bilhões/ano incluindo os custos empregados no controle e extermínio da aflatoxicose. Em amendoim, também na terra do tio Sam as micotoxinas têm causado perdas superiores a \$25,8 milhões/ano. Os agricultores tem amargado prejuízos de aproximadamente \$2,6 milhões/ano. O desoxinivalenol também tem contribuído com \$655 milhões/ano, e a maior parte das perdas correspondem ao trigo. Em países em desenvolvimento, poucas estimativas estão disponíveis, mas partindo de dados elevados referentes aos níveis de contaminação por aflatoxinas frequentemente encontrados nestes países, existe uma alta probabilidade de que as perdas

sejam superiores as perdas dos americanos. Países asiáticos, como Indonésia, Filipinas e Tailândia, anualmente arcam com prejuízo de cerca de \$900 milhões devido a contaminações por aflatoxinas.

Um agravante é a redução no valor comercializado das culturas, afeta não apenas o comércio local mas principalmente as exportações. Em anos com altos índices de contaminação por aflatoxinas nos EUA, toneladas de grãos são rejeitadas por armazéns e compradores porque a sua colheita não deve exceder o limite pré-estabelecido de 20 ppb (partes por bilhão). Em consequência disto os agricultores são forçados a aceitar um preço inferior de mercado ou são obrigados a descartar a sua colheita. A União Européia adota um limite rigoroso de 4 ppb para aflatoxinas em amendoim quem podem gerar um déficit de cerca de \$450 milhões/ano para o ramo da exportação. O impacto das perdas neste setor é agravado pela situação de países em desenvolvimento, onde a população está mais exposta a aflatoxinas, o resultado é a exportação do milho de alta qualidade e a retenção dos grãos de qualidade inferior para o uso doméstico. Outra curiosidade relacionada a comercialização do milho, é que a produção de etanol ao contrário do que muitos pensam podem gerar um impacto econômico negativo; pois um importante subproduto da produção do combustível é a fração seca dos grãos e solúveis destilados (DDGS, da sigla em inglês *dried distillers' grain and solubles*), que são comercializados como componentes de ração animal. As micotoxinas tornam-se mais concentradas nos grãos na DDGS, resultando em um prejuízo estimado de \$18 milhões/ano com fumonisinas para a indústria de suínos americana. Para manter níveis aceitáveis de micotoxinas na DDGS os grãos selecionados devem ser rigorosamente monitorados, em contrapartida isso eleva os custos para as indústrias de etanol e uma perda considerável atribuída às contaminações dos grãos por micotoxinas. Os impactos gerados na saúde humana devido a micotoxicoses, são mais difíceis de quantificar, o que não significa que não existam. Os países em desenvolvimento são os que mais sofrem com essa questão. Surto de aflatoxicose no Quênia são responsáveis por centenas de óbitos. Mais de 98% dos indivíduos avaliados em muitos países do oeste africano testaram positivos para aflatoxicose. Dos \$900 milhões do impacto gerado por aflatoxinas no sudeste asiático, \$500 milhões dos custos foram empregados aos efeitos na saúde humana. E a taxa de câncer, de acordo com o da *National Academy of Science* está intimamente ligado as micotoxinas, não apenas em países em desenvolvimento mas de modo geral. Em escala global, a saúde humana é o maior e mais significativo impacto das micotoxinas, com

elevadas perdas monetárias para custeio com cuidados com a saúde e perdas de produtividade e principalmente para garantir vidas humanas (APS, 2021).

Infelizmente o Brasil não tem feito levantamentos de estatísticas relacionadas aos prejuízos anuais sofridos pelo setor de agronegócios, isso justifica a ausência de dados nacionais relacionados aos impactos econômicos ocorridos no país.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo indica que mesmo que algumas descobertas tenham sido alcançadas por meio dos esforços incessantes de pesquisadores, detectar, qualificar e quantificar de forma satisfatória as micotoxinas, ainda representa um grande desafio para os cientistas pois precisam atentar para a complexidade das matrizes alimentares e também levar em consideração que a quantidade de micotoxinas presentes nos analitos na maioria das vezes é ínfima, isso dificulta o processo. São duas consideráveis barreiras, a quantidade traços de micotoxinas presentes nas amostras e a questão de ser um contaminante natural.

A grande maioria dos métodos de detecção existentes conseguem determinar apenas um tipo de micotoxina, o que se torna algo extremamente alarmante, pois o surgimento de um método simultâneo de múltiplas micotoxinas e que execute tal função nas mesmas condições de trabalho, gerou-se um desafio encontrar uma estratégia eficaz de detecção que seja assertiva. Portanto, o desenvolvimento de sensores com modos de múltipla detecção para caracterizar várias micotoxinas simultaneamente é extremamente promissor para o ensaio de segurança alimentar.

Ficou evidente que é imprescindível o desenvolvimento de uma tecnologia rápida, conveniente e de baixo custo, boa repetibilidade em aplicações práticas entre outros aspectos que foram citados no decorrer desta pesquisa, pois a maioria dos métodos atuais sofrem com a baixa estabilidade. A resposta satisfatória pode estar associada a síntese de novos adsorventes, não se esquecendo que precisam possuir uma melhor seletividade ou especificidade, maior capacidade de adsorção, fator de pré-concentração, ter uma grande área superficial, ser reutilizável, ecologicamente correto e economicamente viável.

Os impactos econômicos gerados devido as contaminações micotoxicológicas geram gastos que superam o PIB de muitos países, além de ser direito da população mundial ter uma saúde de qualidade e para isso exige-se um monitoramento rígido. É relevante salientar que a busca de técnicas e materiais eficientes para caracterizar micotoxinas é inadiável, isso só será satisfeito através de uma técnica eficaz, acessível e que tenha os outros predicados já abordados neste estudo.

Quanto aos adsorventes, o grafeno pode contribuir na resolução do problema e os engenheiros de materiais podem colaborar efetivamente nesta atuação de seleção e caracterização do grafeno e até mesmo de outros materiais que atuem efetivamente a detectar as micotoxinas.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Verificou-se no presente estudo que mesmo após os avanços tecnológicos relacionado às técnicas analíticas utilizadas na detecção das micotoxinas, os custos envolvidos na compra e manutenção dos equipamentos, reagentes envolvidos e mão de obra capacitada para realização de tais análises, ainda são bastante elevados. Lembrando que o controle desta praga é uma questão de saúde pública, é explícita a necessidade de desenvolver técnicas que sejam mais simples, eficientes e com baixo custo para que possam se adequar a todos os tipos de realidades econômicas.

Outro ponto extremamente importante é que preciso estar alerta, ou seja, uma grande massa de micotoxinas pode ser encontrada no mesmo produto porque uma única espécie de fungo pode produzir vários metabólitos tóxicos, mesmo várias espécies de fungos podem estar simultaneamente presentes e produzir toxinas diferentes, vale lembrar dos homólogos de algumas espécies que vem sendo catalogadas ao longo do tempo. E também podem surgir toxinas mascaradas que representam mais um ponto crítico, aumentando a dificuldade na identificação desses toxígenos, o que significa que além de desenvolver um método com características tais como reprodutibilidade e alta eficiência o ideal é que o método seja capaz de qualificar e quantificar o máximo de toxinas possíveis presentes no analito avaliado.

Sem nos esquecermos dos locais onde a realidade econômica não são das melhores e desenvolver algo viável para ser implantado também nesses países, mesmo que seja por via de alguma espécie de patrocínio ou parcerias, pois o direito a saúde deve ser garantido a todas as pessoas independentemente da sua nacionalidade. Investir em pesquisas na área de biossensores e na busca da seleção não apenas do grafeno, mas de novos materiais.

## REFERÊNCIAS

AGRIOPOULOU, Sofia; STAMATELOPOULOU, Eygenia; VARZAKAS, Theodoros. Advances in Analysis and Detection of Major Mycotoxins in Foods. **Foods**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 518-540, 20 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods9040518>.

AGROINDUSTRIAIS, Revista Brasileira de Produtos (ed.). **Segurança de alimentos**. [São Paulo], 2021. Facebook: @medicinaveterinaria.com.br. Disponível em: <https://ja-jp.facebook.com/medicinaveterinaria.com.br/posts/1494602410672008/>. Acesso em: 22 mar. 2021.

ALIBABA (Brasil). Alibaba (org.). **Cromatografia**. 2021. Disponível em: <https://portuguese.alibaba.com/>. Acesso em: 03 abr. 2021.

ALMEIDA, Amanda de *et al.* **Métodos Cromatográficos**. 2013. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/Julai1991/mtodos-cromatograficos>. Acesso em: 14 mar. 2021.

APS (ed.). **Micotoxinas nas Lavouras (Culturas, pt): Um Perigo à Saúde Humana e de Animais Domésticos**: impacto econômico das micotoxinas. Impacto Econômico das Micotoxinas. 2021. Elaborada por APS - The American Phytopathological Society. Disponível em: <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Micotoxinas/Pages/EconomicImpactPort.aspx#:~:text=O%20%C3%B3rg%C3%A3o%20para%20a%20agricultura,toneladas%20de%20alimentos%20e%20derivados>. Acesso em: 29 mar. 2021.

BALENDRES, Mark; KARLOVSKY, Petr; CUMAGUN, Christian. Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins in Agricultural Crop Commodities in the Philippines: a review. **Foods**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 249-261, 8 jul. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods8070249>.

BYTESNIKOVA, Zuzana; ADAM, Vojtech; RICHTERA, Lukas. Graphene oxide as a novel tool for mycotoxin removal. **Food Control**, [S.L.], v. 121, p. 107611, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107611>.

CARNEIRO, Elinton Weinert. **Micotoxinas, um inimigo invisível**. 2020. Elaborada por Agrifirm. Disponível em: <https://www.agrifirm.com.br/artigos-tecnicos/micotoxinas-um-inimigo-invisivel/>. Acesso em: 23 mar. 2021.

**CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC) / ESPECTROMETRIA DE MASSAS**. São Carlos: Fernando M. Lanças, v. 1, n. 2, 2009. Disponível em: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n2a4.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2009.

FERREIRA, Luciely; VIECELI, Miriana; PRATES, Patrícia. **Aflatoxinas e Ocratoxinas em alimentos**. Bento Gonçalves: Faculdade Cinesista de Bento Gonçalves, 2001. 19 slides, color. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/patriciaprates/aflatoxinas-ocratoxina-a>. Acesso em: 21 mar. 2021.

FURLONG, Eliana Badiale. Técnicas cromatográficas acessíveis para determinação de contaminantes fúngicos. **Scientia Chromatographica**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 261-273, 2015. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2016.008>. Disponível em: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v7n4a02.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2021.

GOULART, Daniel Silva. **Aplicações das Técnicas de Cromatografia no Diagnóstico Toxicológico**. 2012. 24 f. Tese (Doutorado) - Curso de Veterinária e Zootecnia, Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

HORKY, Pavel *et al.* Usability of graphene oxide as a mycotoxin binder: In vitro study. **Plos One**, Luleå, p. 1-12, 23 set. 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0239479>. Acesso em: 25 out. 2020.

IAMANAKA, Beatriz Thie; OLIVEIRA, Idjane Santana; TANIWAKI, Marta Hiromi. Micotoxinas em Alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**. Vitória de Santo Antão, p. 138-161. ago. 2010.

ILDIKÓ, Fekete-Kertész. **Conidia of Aspergillus flavus mold**. Disponível em: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/en/node/2780>. Acesso em: 21 mar. 2021.

ISAKEIT, Thomas. **Post-Harvest Handling of a Corn Field Affected by Fumonisin Contamination**. 2017. Disponível em: <https://agrillife.org/texasrowcrops/2017/11/03/post-harvest-handling-of-a-corn-field-affected-by-fumonisin-contamination/>. Acesso em: 23 mar. 2021.

LIDSON NERY (São Paulo). Agroceres Multimix. **Pontos-chave para a escolha de um adsorvente de micotoxinas**. 2020. Disponível em: <https://agroceresmultimix.com.br/blog/pontos-chave-para-e-escolha-de-um-adsorvente-de-micotoxinas/>. Acesso em: 13 mar. 2021.

MARCELO DEL GRANDE (Brasil). Sinc do Brasil. **Cromatografia Gasosa: princípios básicos**. Princípios Básicos. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/eventos/seminariodequimica/1%B0%20Minicurso%20Produ%E7%E3o%20e%20Qualidade%20de%20Biodiesel/cromatografiagasosa.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2021.

MERCADO LIVRE (Brasil). Mercado Livre (org.). **Colunas Cromatografia**. 2021. Disponível em: <https://produto.mercadolivre.com.br>. Acesso em: 03 abr. 2021.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **ISSN 0103-6068: Fungos Potencialmente Ocratoxígenos em Café**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editoração Eletrônica: André Luis do Nascimento Gomes, 2003. 15 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/65527/1/2003-DOC-0053.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2021.

OLIVEIRA, Ana Elisa F. de; PEREIRA, Arnaldo César. Biosensor and Food Industry - Review. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 1311-1333, 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20160094>.

PALAZZESI, Ariel (ed.). **Armaduras de óxido de grafeno**. 2008. Disponível em: <https://www.neoteo.com/armaduras-de-oxido-de-grafeno-5257/>. Acesso em: 15 mar. 2021.

PEGASUS SCIENCE (ed.). **Zearalenona**. 2020. Elaborada por PEGASUS SCIENCE LTDA. Disponível em: <https://www.pegasusscience.com/site/br/micotoxinas/zearalenona>. Acesso em: 23 mar. 2021.

RYE (México). Rye - Reactivos y Equipo S.A. de C.V. (org.). **Cromatografia**. 2021. Disponível em: <https://www.reactivosyequipos.com.mx/producto/camara-cromatografica-de-vidrio-rectangular-ctapa-27x7x25-cm/12316>. Acesso em: 14 mar. 2021.

SÁ, Eloiza Rodrigues Pimentel de. **Avaliação da contaminação por Ocratoxina e Aflatoxinas em amostras de pimenta do reino comercializadas no estado do Rio de Janeiro**. 2017. 53 f. Monografia (Especialização) - Curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017. Cap. 6. Disponível em: [https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/35684/2/Resid%C3%Aancia\\_Eloiza\\_Rodrigues.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/35684/2/Resid%C3%Aancia_Eloiza_Rodrigues.pdf). Acesso em: 22 mar. 2021.

SHANAKHAT, Hina *et al.* Current methods for mycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: an overview. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, [S.L.], v. 98, n. 11, p. 4003-4013, 13 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8933>.

SHOALA, Tahsin. **Carbon nanostructures: detection, controlling plant diseases and mycotoxins**. 6Th Of October City: Elsevier, 2020. 652 p. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012819786800013X>. Acesso em: 25 out. 2020.

SILVA, Julio C. J. **QUI 070 – Química Analítica V Análise Instrumental: aula 11 :: cromatografia líquida de alta eficiência (clae)**. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora - Ufjf, 2014. 34 slides, color. Disponível em: [https://www.ufjf.br/baccan/files/2010/10/Aula\\_11-CL\\_08\\_07\\_14.pdf](https://www.ufjf.br/baccan/files/2010/10/Aula_11-CL_08_07_14.pdf). Acesso em: 01 abr. 2021.

VETTORAZZI, Ariane; CERAIN, Adela López de. **Environmental Mycology in Public Health: fungi and mycotoxins risk assessment and management**. San Diego: Elsevier Science Publishing Co Inc, 2015. 458 p.

WAGNER LUIZ HELENO MARCUS BERTOLINI (Brasil). **Estratégia Concursos (org.). Cromatografia: cromatografia em camada delgada (ccd). Cromatografia em camada Delgada (CCD)**. [2000] data certa não indicada na publicação. Disponível em: [www.estrategiaconcursos.com.br](http://www.estrategiaconcursos.com.br). Acesso em: 02 abr. 2021.

WAN, Jing; CHEN, Bingcan; RAO, Jiajia. Occurrence and preventive strategies to control mycotoxins in cereal-based food. **Comprehensive Reviews In Food Science**

**And Food Safety**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 928-953, 4 mar. 2020. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12546>.

YANG, Yan *et al.* Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs. **Elsevier**. San Diego, 24 dez. 2019. Trends In Food Science & Technology, Seção 96, p. 233-252. Disponível em: <https://www.elsevier.com/locate/tifs>. Acesso em: 25 out. 2020.