

**SARA MARIA OLIVEIRA SANTOS**

**ANÁLISE MICOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DE  
ZEARALENONA E DEOXINIVALENOL EM  
ALIMENTOS COMPOSTOS PARA SUÍNOS**

**Orientador: Dra. Hermínia Marina Lourdes Martins**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias  
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa  
2011**

**SARA MARIA OLIVEIRA SANTOS**

**ANÁLISE MICOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DE  
ZEARALENONA E DEOXINIVALENOL EM  
ALIMENTOS COMPOSTOS PARA SUÍNOS**

Dissertação apresentada para a obtenção de grau de  
Mestre em Medicina Veterinária, no curso de Mestrado  
Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela  
Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientador: Dra. Hermínia Marina Lourdes Martins

Co-orientador: Prof. Doutora Cláudia Sofia Antunes  
Ferreira

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**  
**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**  
**2011**

**Aos meus pais**, por todo o amor e dedicação que demonstram em todos os campos da minha vida, e sem os quais seria impossível realizar este sonho.

**Ao meu avô Luciano**, que demonstrou em presença física, um amor incondicional pela sua família, e que transmite agora, em presença espiritual, amor de igual intensidade, mas sempre de mão dada, com a minha eterna saudade.

## **AGRADECIMENTOS**

Desejo agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a conclusão deste trabalho, disponibilizando meios materiais, orientação e conhecimento.

À Direcção do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, por permitir a realização do meu estágio curricular, proporcionando as condições indispensáveis à sua realização.

À Sra. Prof. Doutora Cláudia Ferreira, da ULHT - Faculdade de Medicina Veterinária, quero manifestar o meu agradecimento por toda a disponibilidade, apoio, simpatia, interesse e incentivo demonstrados, assim como pelos ensinamentos e sugestões que disponibilizou durante a realização do estágio.

Ao Sr. Dr. Jorge Barbosa, Chefe do Departamento de Higiene Pública do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, pela disponibilidade e interesse demonstrados no decorrer do estágio.

À Sra. Dra. Hermínia Marina Lourdes Martins, minha orientadora científica, incansável na disponibilização de meios bibliográficos para a realização deste trabalho, assim como meios materiais, constante entusiasmo na partilha de conhecimento e orientação, amizade e dedicação, durante todo o estágio, a minha sincera gratidão por todo o apoio prestado.

À Carolina Camacho, por toda a amizade demonstrada, e por todos os conhecimentos informáticos que foram tão úteis na realização deste trabalho.

Às técnicas auxiliares do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, do serviço de micologia, Cândida Traça e Anabela Ramos, pela paciência e dedicação na partilha de conhecimentos e experiência, e pela amizade demonstrada ao longo da elaboração deste trabalho.

À Sra. Dra. Cândida Alves, pela grande amizade que demonstrou, e apoio incondicional em cada passo da minha vida académica.

Finalmente, quero demonstrar a minha profunda gratidão aos meus pais, Carlos e Isilda, à minha irmã Sónia, aos meus avós, Isidro e Lúcia, Luciano e Maria. À Raquel, à Inês e à Ana, e especialmente ao Nuno, por todo o apoio e amor que demonstraram ao longo de todo o meu percurso, sem os quais não teria sido possível a sua realização.

## **Análise Micológica e Quantificação de Zearalenona e Deoxinivalenol em Alimentos Compostos para Suínos**

### **RESUMO**

As análises micológica e micotoxicológica representam uma parte importante da monitorização da qualidade e segurança dos alimentos compostos para animais.

O objectivo deste trabalho foi avaliar o nível de contaminação fúngica em amostras de alimentos compostos para suínos, identificar as espécies fúngicas presentes e quantificar os níveis de zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON).

Para tal, foram analisadas 55 amostras, encontrando-se 52 (94.5%) contaminadas com fungos, apresentando teores médios de  $1.7 \times 10^4$  UFC/g. Os fungos mais predominantes foram o *Fusarium* spp (81.8%), o *Aspergillus flavus* (69.0%), as leveduras (60.0%) e o *Aspergillus candidus* (56.3%). A análise micotoxicológica foi efectuada por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), com purificação por colunas IAC (Colunas de imunoafinidade), e revelou 18 amostras positivas para ZEA e 13 positivas para DON, com níveis de ZEA variando entre 6.1 e  $5.4 \times 10^1$  µg/kg, e de DON variando de  $1.0 \times 10^2$  e  $9.0 \times 10^2$  µg/kg. Foi observada co-ocorrência em 3 amostras (5.5%). Todos os resultados encontrados estavam abaixo dos limites máximos permitidos pela União Europeia (UE).

As taxas de recuperação para amostras contaminadas com ZEA, a concentrações de 0.005; 0.010 e 0.10 µg/kg foram de 93.0; 95.0 e 95.0%, respectivamente e as de DON foram de 98.0; 85.0 e 88.0%, para soluções contaminadas com 100.0; 250.0 e 500.0 µg/kg, respectivamente.

**Palavras-chave:** “Deoxinivalenol”, “Zearalenona”, “Alimentos Compostos”, “Suínos”, “HPLC”

# **Mycological analysis and quantification of zearalenone and deoxynivalenol in Swine Feed**

## **ABSTRACT**

Mycological and mycotoxicological analysis represents an important part in monitorization of feed's quality and security.

The aim of this work was to evaluate the contamination levels of mycobiota in swine feed samples, identify the mycobiota species present, and to quantify the levels of zearalenone (ZEA) and deoxinivalenol (DON).

For such, 55 samples were analysed, 52 samples (94.5%) found with fungi contamination, with a mean of  $1.7 \times 10^4$  UFC/g. The most predominant fungi were *Fusarium* sp (81.8%), *Aspergillus flavus* (69.0%), yeasts (60.0 %) and *Aspergillus candidus* (56.3 %). The mycotoxicological analysis was performed by High performance Liquid Chromatography (HPLC), with Immunoaffinity Columns (IAC) purification, and revealed 18 samples positive for ZEA and 13 positive for DON, with levels ranging between 6.1 to  $5.4 \times 10^1$  µg/kg of ZEA and  $1.0 \times 10^2$  to  $9.0 \times 10^2$  µg/kg for DON. It was observed co-occurrence in 3 samples (5.5%). All the results found were bellow the maximum limits permitted by European Union (EU).

The recovery taxa for samples contaminated with ZEA at concentration's level of 0.005; 0.010 and 0.10 µg/kg were 93.0; 95.0 and 95.0%, respectively and DON recovery taxa were 98.0; 85.0 and 88.0%, for spiking concentrations of 100.0; 250.0 and 500.0 µg/kg of DON, respectively.

**Keywords:** "Deoxynivalenol", "Zearalenone", "Feed", "Swine", "HPLC"

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

60s - Sub-unidade ribossomal  
ADN - Ácido desoxirribonucleico  
AFs - Aflatoxinas  
ALP - Alanina aminotransferase  
ARN - Ácido ribonucleico  
AST – Aminotransferase  
ATA - Aleucémia Tóxica Alimentar  
Aw – Teor de água activa  
C1 - Resultado da quantificação da amostra fortificada  
C2 - Resultado da quantificação da testemunha  
C3 - Valor do padrão  
CE - Comissão Europeia  
CEN - *European Committee for Standardization* (Comité Europeu de Normalização)  
DON - Deoxinivalenol  
EU – European Union (União Europeia)  
FIR - *Flame ionisation detector* (detector de ionização de chama)  
FTIR - *Fourier transform infrared spectroscopy* (Espectroscopia Infravermelho Transformada De Fourier)  
GGT -  $\gamma$ -glutamate transferase  
HACCP - *Hazard Analysis Critical Control Point* (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo)  
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Performance)  
HSD - Hidroxiesteróide desidrogenase  
IAC - *Immunoaffinity Columns* (Colunas de Imunoafinidade)  
IACA - Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais  
IgA – Imunoglobulina A  
IgG – Imunoglobulina G  
LNIV - Laboratório Nacional de Investigação Veterinária  
 $m$  - Massa da amostra, em gramas  
 $M$  - Massa total da amostra, em gramas  
MDA – *Malondialdehyde* (malondialdeído)  
 $Mg^{2+}$  - Catião bivalente magnésio  
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MS - *Mass spectrometry* (espectrometria em massa)

O<sub>2</sub> - Oxigénio

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (solução fosfatada tamponizada)

PKS - Poliquétido sintetase

ppb - Partes por bilião

ppm - Partes por milhão

TMM - Teores Micológicos Médios

TMT - Teores Micológicos Totais

ton - Tonelada

UDPGT - Uridina difosfato glucuronil transferas

UE - União Europeia

UFC - Unidade Formadora de Colónias

UV - Ultravioleta

$V_{clean}$  - Fracção de volume a ser eluído, em mililitros

$V_{ext}$  - Fracção de volume do extracto, em mililitros

$V_{redis}$  - Volume de redissolução (fase móvel), em mililitros

$V_S$  - Volume de solvente de extracção, em mililitros

$w_c$  - Teor em micotoxina (ZEA, DON), em  $\mu\text{g/Kg}$

$w_c$  (DON) - Teor de DON

$w_c$  (ZEA) - Teor de ZEA

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

ZEA - Zearalenona

$\alpha$ -ZEA -  $\alpha$ -Zearalenol

$\beta$  - ZEA -  $\beta$  - Zearalenol

$\rho$  - Concentração de DON, ng/ml

# ÍNDICE GERAL

|                                                                |              |
|----------------------------------------------------------------|--------------|
| Agradecimentos .....                                           | iii          |
| Resumo .....                                                   | iv           |
| Abstract .....                                                 | v            |
| Lista de Símbolos e Abreviaturas .....                         | vi           |
| Índice Geral .....                                             | viii         |
| Índice de Quadros .....                                        | xii          |
| Índice de Gráficos.....                                        | xiii         |
| Índice de Figuras .....                                        | xiv          |
| <br><b>INTRODUÇÃO.....</b>                                     | <br><b>1</b> |
| <br><b>PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                | <br><b>4</b> |
| <b>1. A Indústria de alimentos compostos para animais.....</b> | <b>4</b>     |
| 1.1 Expressão sectorial .....                                  | 4            |
| 1.2 Aprovisionamentos .....                                    | 4            |
| 1.3 Fabrico de alimentos compostos .....                       | 4            |
| 1.4 Alimentos compostos para suínos .....                      | 5            |
| <b>2. O Reino dos fungos.....</b>                              | <b>6</b>     |
| 2.1 Definição e características biológicas .....               | 6            |
| 2.2 Classificação dos fungos .....                             | 9            |
| 2.3 Factores que influenciam o crescimento micológico .....    | 10           |
| 2.3.1 Factores físicos.....                                    | 10           |
| 2.3.2 Factores químicos .....                                  | 12           |
| 2.3.3 Factores biológicos.....                                 | 12           |

|                                                                                                                                  |                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4                                                                                                                              | Origem das diferentes contaminações fúngicas dos alimentos compostos ..... | 13        |
| 2.5                                                                                                                              | Importância da análise micológica .....                                    | 13        |
| 2.6                                                                                                                              | Principais fungos contaminantes de alimentos compostos para animais ..     | 15        |
| <b>3.</b>                                                                                                                        | <b>Metabolitos secundários dos fungos: as micotoxinas .....</b>            | <b>20</b> |
| 3.1                                                                                                                              | Caracterização das micotoxinas .....                                       | 20        |
| 3.2                                                                                                                              | Perspectiva histórica.....                                                 | 22        |
| 3.3                                                                                                                              | Principais micotoxinas contaminantes de alimentos .....                    | 23        |
| 3.4                                                                                                                              | A problemática das micotoxinas .....                                       | 24        |
| 3.5                                                                                                                              | Zearalenona .....                                                          | 26        |
| 3.5.1                                                                                                                            | Biossíntese e propriedades físico-químicas .....                           | 26        |
| 3.5.2                                                                                                                            | Actividade biológica nos animais .....                                     | 27        |
| 3.6                                                                                                                              | Deoxinivalenol .....                                                       | 29        |
| 3.6.1                                                                                                                            | Biossíntese e propriedades físico-químicas .....                           | 30        |
| 3.6.2                                                                                                                            | Actividade biológica nos animais .....                                     | 30        |
| 3.7                                                                                                                              | Co-ocorrência de ZEA e DON .....                                           | 32        |
| 3.8                                                                                                                              | Controlo das micotoxinas .....                                             | 32        |
| 3.9                                                                                                                              | Legislação .....                                                           | 35        |
| <b>4.</b>                                                                                                                        | <b>Aparelhos de detecção e quantificação de micotoxinas .....</b>          | <b>37</b> |
| 4.1                                                                                                                              | Técnicas imunoenzimáticas.....                                             | 38        |
| 4.2                                                                                                                              | Cromatografia Líquida de Camada Fina .....                                 | 39        |
| 4.3                                                                                                                              | Cromatografia Gasosa (CG) .....                                            | 39        |
| 4.4                                                                                                                              | Cromatografia Líquida de Alta Performance .....                            | 40        |
| <br><b>PARTE II - ANÁLISE MICOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DE ZEARELENONA E DEOXINIVALENOL EM ALIMENTOS COMPOSTOS PARA SUÍNOS.....</b> |                                                                            | <b>42</b> |
| <b>1.</b>                                                                                                                        | <b>Colheita e transporte de amostras .....</b>                             | <b>42</b> |
| <b>2.</b>                                                                                                                        | <b>Material e Métodos.....</b>                                             | <b>44</b> |
| 2.1                                                                                                                              | Isolamento e identificação da micoflora .....                              | 44        |

|           |                                                                                                                                                                                                                           |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.1     | Preparação da suspensão e diluição .....                                                                                                                                                                                  | 44        |
| 2.1.2     | Realização de Sementeiras .....                                                                                                                                                                                           | 44        |
| 2.1.3     | Identificação e contagem de colónias de bolores e leveduras.....                                                                                                                                                          | 44        |
| 2.2       | Quantificação de micotoxinas .....                                                                                                                                                                                        | 45        |
| 2.2.1     | Procedimento para isolamento de Zearalenona.....                                                                                                                                                                          | 45        |
| 2.2.2     | Procedimento para isolamento de Deoxinivalenol.....                                                                                                                                                                       | 45        |
| 2.2.3     | Determinação de micotoxinas por HPLC .....                                                                                                                                                                                | 46        |
| 2.2.4     | Cálculo de resultados da análise micotoxicológica .....                                                                                                                                                                   | 48        |
| <b>3.</b> | <b>Resultados e Discussão.....</b>                                                                                                                                                                                        | <b>50</b> |
| 3.1       | Análise Micológica.....                                                                                                                                                                                                   | 50        |
| 3.2       | Análise Micotoxicológica.....                                                                                                                                                                                             | 55        |
|           | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                    | <b>60</b> |
|           | <b>Bibliografia.....</b>                                                                                                                                                                                                  | <b>62</b> |
|           | <b>Apêndices.....</b>                                                                                                                                                                                                     | <b>i</b>  |
|           | <b>Apêndice A</b> - Resultados da análise micológica efectuada em 55 amostras de alimentos compostos para suínos.....                                                                                                     | ii        |
|           | <b>Apêndice B</b> – Resultados comparativos entre os níveis de <i>Fusarium</i> spp. e os níveis de ZEA e DON quantificados.....                                                                                           | iv        |
|           | <b>Apêndice C</b> – Níveis de contaminação das amostras analisadas, com zearalenona e deoxinivalenol.....                                                                                                                 | v         |
|           | <b>Anexos.....</b>                                                                                                                                                                                                        | <b>vi</b> |
|           | <b>Anexo A</b> - Recomendação N° 576/2006.....                                                                                                                                                                            | vi        |
|           | <b>Anexo B</b> - Norma Portuguesa 3277-2 (2002).....                                                                                                                                                                      | ix        |
|           | <b>Anexo C</b> - European Standart EN 15792:2009.....                                                                                                                                                                     | xvi       |
|           | <b>Anexo D</b> - European Standart EN 15791:2009.....                                                                                                                                                                     | xxx       |
|           | <b>Anexo E</b> – Almeida, I., Martins, H.M., Santos, S., Costa, J.M., Bernardo, F. (2011). Co-occurrence of mycotoxins in swine feed produced in Portugal, <i>Mycotoxin Research</i> , DOI 10.1007/s12550-011-0093-8..... | xxxvi     |

**Anexo F** - Almeida, I., Santos, S., Martins, H.M., Costa, J.M. (2011). Occurrence of Zearalenone and Deoxynivalenol in plant crops, 4th International Symposium Mycotoxins: Challenges and Perspectives, Ghent, Bélgica.....Li

**Anexo G** – Almeida, I., Santos, S., Martins, H.M., Costa, J.M. (2011). Zearalenone and Deoxynivalenol in mixed-feed for swine, 4th International Symposium Mycotoxins: Challenges and Perspectives, Ghent, Bélgica.....Liii

## ÍNDICE DE QUADROS

|                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1. Composição das amostras de alimentos compostos para suínos em fase reprodutiva e em fase de engorda analisadas.....                                                                                                     | 6  |
| Quadro 2. Temperaturas de desenvolvimento óptimo de vários fungos. ....                                                                                                                                                           | 11 |
| Quadro 3. Valores de referência para classificação de amostras de alimentos compostos, de acordo com os teores micológicos totais encontrados (fonte: Valores de referência adaptados de Laffond-Grellety, 1972); (*) UFC/g. .... | 14 |
| Quadro 4. Principais espécies fúngicas responsáveis pela produção de micotoxinas (fonte: adaptado de Marques, 2007). ....                                                                                                         | 21 |
| Quadro 5. Caracterização das micotoxicoses primária e secundária, e de doenças secundárias às micotoxinas (fonte: Adaptado de Pier <i>et al.</i> , 1980). ....                                                                    | 22 |
| Quadro 6. Guia de níveis máximos aceitáveis de micotoxinas em alimentos compostos para suínos (fonte: União Europeia, Recomendação (CE) Nº 576/2006). ....                                                                        | 37 |
| Quadro 7. Subdivisão dos lotes em função do produto e do peso do lote (fonte: União Europeia, Regulamento (CE) Nº 401/2006). ....                                                                                                 | 43 |
| Quadro 8. Médias dos teores micológicos dos géneros e espécies fúngicas detectados nas amostras analisadas. ....                                                                                                                  | 52 |
| Quadro 9. Frequência e percentagens de amostras positivas e negativas para a presença de ZEA e DON, máximos, mínimos e médias encontradas.....                                                                                    | 55 |
| Quadro 10. Frequência e percentagem de amostras positivas para ZEA, agrupadas de acordo com o teor micotoxicológico. ....                                                                                                         | 56 |
| Quadro 11. Frequência e percentagem de amostras positivas para DON, agrupadas de acordo com o teor micotoxicológico. ....                                                                                                         | 56 |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Percentagem de amostras classificadas de acordo com a sua qualidade..... 51

Gráfico 2. Frequência dos diferentes géneros e espécies de fungos contaminantes das amostras analisadas. .... 51

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Alimento composto granulado para suínos (fonte: Original, 2011). .....                                                                                                                                                         | 5  |
| Figura 2. Milho contaminado por fungos (fonte: Phuong, 2010). .....                                                                                                                                                                      | 9  |
| Figura 3. Colónia de <i>Aspergillus flavus</i> em meio Sabourard (ao centro), envolvida por colónias de <i>Fusarium</i> spp. (fonte: Original, 2011). .....                                                                              | 17 |
| Figura 4. Colónias de <i>Fusarium</i> spp. (fonte: Original, 2010). .....                                                                                                                                                                | 18 |
| Figura 5. Colónias de <i>Penicillium</i> spp. em meio Sabourard (fonte: Original, 2011). .....                                                                                                                                           | 19 |
| Figura 6. Colónias de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Mucor</i> spp. (fonte: Original, 2011). .....                                                                                                                                            | 20 |
| Figura 7. Representação da estrutura química da zearalenona (fonte: European Mycotoxin Awareness Network, 2011). .....                                                                                                                   | 27 |
| Figura 8. Estruturas químicas dos derivados da zearalenona, $\alpha$ -zearalenol e $\beta$ -zearalenol (fonte: Marques, 2007, p.26). .....                                                                                               | 28 |
| Figura 9. Sinais clínicos em suínos com micotoxicose induzida por zearalenona (fonte: Voorsluys, 2010); A: Edema e hiperemia da vulva em leitoas; B; <i>Splayleg</i> em suínos recém-nascidos; C: Prolapso vulvar; D: Edema vulvar. .... | 29 |
| Figura 10. Representação da estrutura química do deoxinivalenol (fonte: Purdue University, 2001). .....                                                                                                                                  | 30 |
| Figura 11. Esquema representativo da acção da coluna sobre o extracto injectado (fonte: Analytical Venture, 2008). .....                                                                                                                 | 41 |
| Figura 12. Fases da amostragem de alimentos compostos para animais (fonte: Costa, 2005). .....                                                                                                                                           | 42 |
| Figura 13. Coluna de imunoafinidade utilizada na extração de DON (fonte: Original, 2011). .....                                                                                                                                          | 46 |
| Figura 14. Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Performance utilizado na quantificação de micotoxinas (fonte: Original, 2011). .....                                                                                                | 47 |

## INTRODUÇÃO

As suiniculturas, principalmente as que operam em regime intensivo, são dependentes de alimentos compostos para suprir as necessidades nutricionais dos seus efectivos. A indústria de alimentos compostos contribui para o funcionamento de milhares de explorações pecuárias e agro-pecuárias em Portugal, sendo o 3º negócio mais importante neste sector. Contribui também, de forma definitiva, para os rendimentos agrícolas (Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais [IACA], 2009).

As matérias-primas utilizadas na formulação dos alimentos compostos para suínos, devem possuir elevada qualidade e segurança, para que o processo de produção não fique comprometido. Essas matérias-primas podem ser contaminadas por fungos nas diversas fases de produção: antes da colheita, pela flora de campo; nos processos de transformação, pela flora intermédia; ou no transporte e armazenamento, pela flora de armazenamento (Martins, 1987, p.60). Os alimentos compostos para animais, podem ser contaminados durante o seu processamento, através da mistura de matérias-primas contaminadas, assim como nos processos de transporte e armazenamento. Algumas das espécies fúngicas envolvidas nestas contaminações, alteram as características organolépticas dos alimentos, podendo resultar na diminuição da ingestão de alimentos por parte dos animais, ou recusa alimentar, além das alterações no valor nutritivo dos alimentos que pode ocorrer (Torrado, 2007, p.28). Algumas espécies fúngicas são ainda toxigénicas, tendo a capacidade de produzir metabolitos secundários tóxicos nos alimentos destinados ao consumo animal, nomeadamente as micotoxinas.

As micotoxinas são quimicamente muito estáveis e persistem nos alimentos compostos, mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (Oliveira, 2006, p.1). As micotoxinas são responsáveis por perdas económicas muito significativas, que podem ser contabilizadas através dos custos das medidas de prevenção contra a contaminação de matérias-primas e alimentos compostos por fungos e micotoxinas, custos de destruição de rações contaminadas, perdas dos índices produtivos em várias espécies animais e tratamentos veterinários aplicados às micotoxicoses agudas ou crónicas.

Estão catalogadas várias micotoxinas que contaminam frequentemente alimentos, pelo que a escolha da análise de ZEA e DON esteve associada a duas questões fundamentais: estas duas micotoxinas ocorrem frequentemente em concentrações toxicologicamente relevantes em alimentos para animais analisados na Europa (Döll & Dänicke, 2011), e a indústria suinicultora assenta o seu retorno financeiro nos índices

produtivos e reprodutivos dos animais, sendo que estas duas micotoxinas afectam directamente esses factores. Os distúrbios causados por estas micotoxinas incluem diminuição do ganho de peso e alterações reprodutivas, que reduzem directamente a produtividade associada a esta espécie animal.

Com o objectivo de controlar os efeitos adversos da contaminação dos alimentos com micotoxinas, a União Europeia disponibiliza legislação relativa às quantidades máximas destes metabolitos recomendadas, nos alimentos de várias espécies animais.

Em Portugal, com base em procedimentos regulamentados, são colhidas amostras de alimentos compostos para suínos, que são depois analisadas quanto à quantidade de micotoxinas presentes. A presença de micotoxinas em valor superior ao recomendado pela União Europeia, obriga à destruição de todo o lote de alimentos em questão. Estas análises, em conjunto com a análise micológica dos alimentos, permitem aferir sobre a segurança e qualidade dos alimentos compostos utilizados na alimentação de suínos, permitindo a monitorização e a melhoria contínua das técnicas de prevenção contra a contaminação.

O trabalho aqui apresentado foi desenvolvido durante o Estágio Curricular de conclusão do Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT).

O estágio decorreu no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), tendo sido supervisionado pela Dr<sup>a</sup>. Hermínia Marina Loudes Martins, que ali desempenha função de Investigadora Principal do Serviço de Micotoxicologia, do Departamento de Higiene Pública.

O LNIV procede à análise de amostras, pela técnica de HPLC e purificação com colunas de imunoafinidade. O HPLC, devido à sua alta sensibilidade e especificidade, é uma das técnicas mais utilizadas na rotina de monitorização deste tipo de alimentos.

No período entre 4 de Outubro e 4 de Julho de 2011, foram acompanhadas e realizadas todas as actividades de análise dos alimentos compostos, e foi feita toda a pesquisa de literatura necessária para a realização deste trabalho.

As actividades que foram desenvolvidas durante o estágio, incluíram a realização da análise micológica de 55 amostras de alimentos compostos para suínos, assim como a quantificação de ZEA e DON nas mesmas amostras.

Na sequência do trabalho desenvolvido durante o estágio realizado no laboratório de Micotoxicologia do LNIV, foram publicados os seguintes trabalhos: um artigo, intitulado de “Co-occurrence of mycotoxins in swine feed produced in Portugal”, na revista *Mycotoxin research* (ANEXO E), assim como duas apresentações “afixadas”, no 4º simpósio internacional de micotoxinas – Perspectivas e desafios (realizado em Ghent), intitulados

“Occurrence of Zearalenone and Deoxynivalenol in plant crops” (ANEXO F) e “Zearalenone and Deoxynivalenol in mixed-feed for swine.” (ANEXO G).

O objectivo deste trabalho foi avaliar o nível de contaminação fúngica em alimentos compostos para suínos, identificar as espécies fúngicas mais frequentes e avaliar os níveis de contaminação com ZEA e DON.

## **PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1. A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS COMPOSTOS PARA ANIMAIS**

#### **1.1 Expressão sectorial**

A indústria de alimentos compostos para animais é relativamente recente em Portugal, mas é essencial ao funcionamento das explorações agro-pecuárias, contribuindo de forma decisiva para a formação de uma parte substancial dos rendimentos agrícolas. O valor da sua produção e do sector dos fabricantes de pré-misturas aproxima-se dos 1.000 milhões de euros/ano, estando ao seu alcance incorporar uma parcela cada vez mais importante dos recursos agrícolas nacionais (IACA, 2009).

#### **1.2 Aprovisionamentos**

Portugal é dependente em 70 % de alimentos compostos importados, quer de outros estados membros da União Europeia, quer de estados não membros. As fábricas de alimentos compostos nacionais, possuem sistemas HACCP (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo) implementados, no entanto, as condições de produção de matérias-primas obtidas especialmente de países terceiros, não são totalmente controladas (Almeida, Martins, Santos, Costa, & Bernardo, 2011).

As características das matérias-primas incorporadas em alimentos compostos para animais, são essenciais para garantir a sua segurança e a qualidade do produto final, como já foi referido. Estas são escolhidas de acordo com numerosos factores como o preço, disponibilidade no mercado e capacidade de armazenagem, entre outros condicionalismos.

#### **1.3 Fabrico de alimentos compostos**

Os alimentos compostos são formulados por nutricionistas e zootécnicos, com o objectivo de fornecer fontes nutritivas completas aos animais, de acordo com a sua espécie, raça, idade, estado fisiológico e estado reprodutivo. Entre as fases de fabrico de alimentos compostos, encontram-se as fases de transporte e armazenamento das matérias-primas, doseamento, moenda, mistura, granulação, incorporação de gorduras e melaços, aplicação de antifúngicos, entre outros, variando de acordo com a empresa (Torrado, 2007, p.8).

A qualidade e segurança das matérias-primas e dos alimentos compostos, vai influenciar directamente, a saúde e a produtividade dos efectivos animais. Essa qualidade depende das precauções que forem adoptadas nas fases de colheita, pós-colheita, transporte, armazenamento, processamento, embalagem e distribuição das matérias-primas e alimentos compostos processados. Uma das partes integrantes da manutenção da segurança alimentar em Indústrias de alimentos compostos para animais, é a implementação de sistemas HACCP, que inclui a análise rotineira de amostras representativas de destes alimentos (figura 1). Estas análises permitem aferir da segurança dos alimentos analisados, evitando as consequências associadas à ingestão de produtos tóxicos, e permite, por outro lado, avaliar a evolução da segurança alimentar nestas fábricas, ao longo do tempo.



**Figura 1. Alimento composto granulado para suínos (fonte: Original, 2011).**

#### **1.4 Alimentos compostos para suínos**

No panorama das Indústrias de suinicultura, os custos da alimentação dos efectivos pode atingir até 75% de todos os custos de uma exploração, constituindo assim um encargo determinante na produtividade das explorações (IACA, 2011).

A produção nacional de alimentos compostos para animais, distribui-se de forma desigual, com 28% da produção destinada ao consumo por efectivos suínos. Dessa percentagem, 18% da produção é direccionada a suínos em fase de crescimento e engorda, 4% a suínos de iniciação, restando 6% de alimentos compostos para outros tipos de suínos.

A composição dos alimentos compostos para animais, afecta directamente o tipo de flora microbiológica que os possa contaminar, contribuindo assim para a saúde e bem-estar dos animais. O quadro 1 apresenta a composição das amostras de alimentos compostos para suínos em fase de engorda e em fase reprodutiva, que foram analisadas.

| <b>Composição</b>   |                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>das</b>          | <b>Suíños em fase reprodutiva</b>                                                                                                                                                                                                               | <b>Suíños em fase de engorda</b>                                                                                                                                                                                                   |
| <b>amostras</b>     |                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>analizadas</b>   |                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Ingredientes</b> | Cevada, milho, bagaço de soja obtido por estracção, bagaço de colza obtido por estracção, trigo, farinha forrageira de milho, sêmea de trigo, bagaço de palmiste obtido por pressão, carbonato de cálcio, cloreto de sódio e fosfato dicálcico. | Milho, trigo, cevada, bagaço de soja torrada obtido por estracção, sêmea de trigo, bagaço de colza obtido por estracção, sementes de soja torrada, carbonato de cálcio, fosfato dicálcico, cloreto de sódio e óleo de soja         |
| <b>Nutrientes</b>   | Proteína Bruta (18 %), matéria gorda bruta (2,2 %), fibra bruta (6,5 %), lisina (0,84 %), cinza bruta (6 %), cálcio (0,85%), fósforo (0,5 %), sódio (0,18 %), metionina (0,22 %), vitamina E, A, D3, aminoácidos e oligoelementos.              | Proteína Bruta (17,5 %), matéria gorda bruta (3 %), fibra bruta (5 %), sódio (0,17 %), cinza bruta (6,3 %), cálcio (0,85%), fósforo (0,6 %), lisina (1,01 %), metionina (0,28 %), vitamina E, A, D3, aminoácidos e oligoelementos. |

**Quadro 1. Composição das amostras de alimentos compostos para suínos em fase reprodutiva e em fase de engorda analisadas.**

## **2. O REINO DOS FUNGOS**

### **2.1 Definição e características biológicas**

O Reino Fungi constitui-se de um grupo de organismos pertencentes ao domínio *Eukaryota*. Pensa-se que existam cerca de 1.5 milhões de espécies fúngicas no planeta, apesar de a maioria não ter ainda sido identificada e descrita, devido à falta de estudos micológicos intensivos em áreas tropicais e sub-tropicais (Guarro, Gené, & Stchigel, 1999). Estas espécies estão distribuídas nos mais diversos habitats, variando de organismos de grandes dimensões, como os cogumelos, a formas microscópicas, como os bolores e as leveduras.

No século XVIII, os fungos eram classificados de acordo com a sua morfologia e fisiologia, mas o desenvolvimento de novas técnicas moleculares, incluindo técnicas de análise de ADN (ácido desoxiribonucleico), promoveram profundas alterações na

classificação micológica (Hibbett *et al.*, 2007). Até aos anos 60, manteve-se a tradicional divisão em três reinos: animal, vegetal e mineral, e só a partir dessa década, o ecologista norte-americano Robert Handing Whittaker propôs a actual divisão em seis reinos: Monera, Protista, Plantae, Animalia, Mineralis e Fungi. Os fungos divergiram das plantas há cerca de mil milhões de anos (Bruns, 2006) e foi o aumento do conhecimento relativo a estes seres, que ditaram a sua exclusão do Reino Plantae e a sua integração num novo reino exclusivo, o Reino Fungi.

Os fungos são constituídos por filamentos, organizados segundo diferentes graus de complexidade, denominados de hifas. Estas podem ser asseptadas ou septadas. Existem também, fungos que não exibem fase filamentosa, pelo menos em grande parte do seu ciclo de vida, sendo por isso predominantemente unicelulares, como as leveduras. Alguns fungos apresentam a capacidade de alternarem entre a forma filamentosa e a forma típica de levedura, de acordo com as condições ambientais, denominando-se por isso fungos dimórficos (Karkowska-Kuleta, Rapala-Kozik, & Kozik, 2009). A hifa constitui a forma vegetativa dos bolores, representando o seu principal elemento de crescimento (Kobayashi, 1980). O conjunto das hifas constitui o micélio, e este subdivide-se em três tipos, de acordo com a função fisiológica que cumpre: o micélio vegetativo é constituído pelas hifas que penetram o substrato para absorverem nutrientes, o micélio aéreo é constituído pelas hifas que se projectam acima do substrato e o micélio reprodutivo constitui a parte especializada na produção de esporos. O micélio fúngico é uma das estruturas mais importantes para a correcta identificação do género ou espécie fúngica em presença. Podem ocorrer duas formas de crescimento nos organismos fúngicos, o crescimento apical, através do alongamento do ápex de uma hifa, e o crescimento bidirecional, através da ramificação lateral da hifa (Harris, 2008).

Os fungos são seres heterotróficos, utilizando diversas formas de matéria orgânica como fonte de energia, dividindo-se em 3 grupos ecológicos: saprófitos, parasitas e simbiontes (Peito, 1993). Possuem uma membrana nuclear bem definida, pela qual os nutrientes passam em forma solúvel, sendo esta nutrição do tipo osmotrófica.

A reprodução dos fungos pode ocorrer através de processos assexuados ou sexuados. Os mecanismos de reprodução assexuada incluem a esporulação, gemulação, divisão binária e fragmentação das hifas, e são responsáveis pela dispersão da maioria dos fungos (Torrado, 2007, p.10). A esporulação é um processo muito relevante para a reprodução fúngica, já que leva à formação de estruturas com características morfológicas e biológicas diferentes, os esporos, que permitem a sua disseminação. A reprodução sexuada, ocorre quando surge uma modificação no ambiente do microbiota, susceptível de comprometer a sua sobrevivência. Os novos génotipos criados estão mais adaptados ao

novo ambiente, permitindo assim a manutenção do fungo. Este tipo de reprodução só é conhecido num grupo específico de fungos denominados de Fungos Perfeitos, e pode ocorrer por plasmogamia e cariogamia.

O estudo das características do Reino fungi tem um interesse especial, pelas vertentes que este apresenta: a vertente benéfica e a prejudicial.

A descoberta mais importante para a humanidade, em termos micológicos, foi feita por Alexander Fleming em 1929. Este reconheceu a actividade antibacteriana de uma substância secretada pelo fungo *Penicillium notatum* numa placa contaminada (Bush, 2010), permitindo o seu uso, mais tarde, no tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana. Os fungos são utilizados na alimentação, na produção de antibióticos, como agentes biológicos no controlo de ervas daninhas e pragas agrícolas, assim como na fermentação alimentar usada no vinho, cerveja e molho de soja, entre outros.

Os fungos são também essenciais como microrganismos decompositores de matéria orgânica, participando na reciclagem do solo, restituindo-lhe nutrientes que as plantas haviam anteriormente utilizado nos seus metabolismos. Sem esta reposição, a sobrevivência do ecossistema estaria comprometida.

Apesar de ser reconhecida a extrema importância dos fungos no ecossistema, a verdade é que eles são, por outro lado, responsáveis pela contaminação e decomposição de matéria orgânica viva, alterando as suas características físicas, químicas e organolépticas, desencadeando alterações morfo-fisiológicas em plantas e animais. Para a sua sobrevivência e proliferação, os fungos necessitam de absorver do substrato determinados nutrientes. A maioria dos nutrientes não se encontra em formas directamente utilizáveis por estes, pelo que os mesmos desenvolveram a capacidade de os desdobrar em elementos mais simples. Este desdobramento é feito por diversas enzimas, e a consequência deletéria destas reacções enzimáticas, é a alteração da composição do substrato, que origina, por sua vez, alterações físicas visíveis. Estes fungos denominam-se de fungos parasitas, e são responsáveis pela degradação de matérias-primas e de produtos transformados destinados ao consumo (figura 2), causando um impacto negativo na economia. As colheitas de *mung bean*, por exemplo, são afectadas por fungos patogénicos como *Rhizoctonia solani*, causando o apodrecimento e dessecação das suas plantas (Vijayan & Kirti, 2011).

São várias as matérias-primas e os alimentos que, contaminados por fungos, adquirem características organolépticas indesejáveis. Produtos como queijos, farinhas, lacticínios, e muitos mais, sofrem alterações de coloração, quando contaminados com fungos como *Aspergillus candidus*, *Aspergillus niger* ou *Penicillium* spp. Estes fungos promovem o aparecimento de manchas de cor variável, de acordo com o agente contaminante.

A hidrólise de ácidos gordos e a formação de ácido capróico, ácido caprílico ou ácido cáprico, ou em corpos cetônicos, confere cheiros desagradáveis aos substratos. Os fungos envolvidos neste processo são *Aspergillus* spp., *Mucorales*, leveduras e *Penicillium* spp. (Martins, 1987, p.70). A textura e o sabor são outras características organolépticas que podem ser alteradas em consequência de contaminação fúngica. Os géneros *Aspergillus* e *Penicillium* são responsáveis por sabores amargos ou desagradáveis em cereais e os seus derivados (Martins, 1987, p. 70).

As contaminações são responsáveis também, pela redução do valor nutricional e palatabilidade dos alimentos compostos, além de aumentarem o seu potencial alergénico (Scudamore & Livesey, 1998). Alguns fungos são ainda oportunistas e altamente patogénicos para os humanos, como por exmplo, a *Candida albicans* que pode causar septicemia e mesmo morte (Zipfel, Skerka, Kupka, & Luo, 2011).



**Figura 2. Milho contaminado por fungos (fonte: Phuong, 2010).**

O efeito deletério mais relevante dos fungos, é a sua capacidade de provocar doença grave ou mesmo morte, em plantas e animais. O número de infecções fúngicas em seres humanos tem aumentado nas duas últimas décadas, devido ao uso de fármacos antibacterianos, agentes imunossuppressores após transplante de órgãos, terapia contra o cancro ou cirurgias avançadas (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Fungos patogénicos oportunistas podem invadir o organismo, e causar infecções em vários órgãos, especialmente em pacientes imunodeprimidos (Latgé, 2001; Rhodes & Brakhage, 2006). A sua capacidade de crescer a 37°C, a produção de queratinase que permite aos fungos dermatófilos digerir pele, cabelo e unhas e ainda o dimorfismo dos fungos que lhes permite passar da sua forma filamentosa para levedura no hospedeiro, torna estes organismos potencialmente patogénicos (Cartage, 2006).

## **2.2 Classificação dos fungos**

Os sistemas de classificação disponíveis, nem sempre apresentam um esquema de classificação comum, devido à morfologia muito variada dos organismos indexados no Reino Fungi e à evolução no arranjo dos taxa ao longo das últimas décadas, proporcionado

pelo avanço das técnicas moleculares (Marques, 2007, p.15). No entanto, é importante sistematizar e catalogar os caracteres fenotípicos que estão na base das chaves dicotómicas de classificação, para que o seu estudo e divulgação sejam facilitados.

O sistema de classificação de Hawksworth et al (1995), reconhecem no Reino dos Fungos as seguintes divisões: *Chytridiomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* e *Deuteromycotina* (Hawksworth, Kirk, Sutton, & Pegler, 1995).

A divisão *Deuteromycotina* é constituída por fungos cuja reprodução sexuada não é conhecida, ou não estava presente aquando da sua identificação, sendo esta divisão conhecida por *Fungi Imperfecti*. A maioria dos géneros de fungos contaminantes da indústria alimentar, como o *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. e *Trichoderma* spp., pertencem a esta divisão – *Ascomycetes* e *Basidiomycetes* (Santos, Venâncio, & Lima, 1998).

### **2.3 Factores que influenciam o crescimento micológico**

A biodegradação das matérias-primas e dos transformados industriais destinados à alimentação, é um processo complexo que depende de condições ecológicas variadas, como a temperatura, a humidade, a tensão de O<sub>2</sub>, a luminosidade, o pH (potencial de hidrogénio iónico), a presença de produtos químicos estabilizadores e de outros factores bióticos. A intensidade e natureza destas biodegradações, variam com o teor micológico inicial, com as espécies fúngicas presentes e com a composição do substrato. As alterações induzidas pela presença de contaminação fúngica nos géneros alimentícios incluem alterações físicas, químicas e organolépticas.

A curva de crescimento dos fungos é influenciada por diversos factores, como a estirpe em presença, a natureza do substrato e as condições do meio. Os parâmetros que afectam o crescimento dos fungos são a temperatura, o pH, a natureza do substrato, a tensão de O<sub>2</sub>, as radiações, o teor de água activa (Aw), a osmofilia, a acção dos agentes químicos e a competição microbiana.

#### **2.3.1 Factores físicos**

O teor de água activa presente no substrato, é um dos factores mais importantes para o desenvolvimento fúngico. Os fungos necessitam de valores de Aw mais baixos que os outros microrganismos, mas na presença de valores de Aw inferiores a 0.62, o crescimento fúngico cessa (Rosset, 1986). Os esporos são formas de reprodução

assexuada, e são resistentes à secura durante bastante tempo, mas só com valores de Aw variando entre 0.7 e 0.94, ocorre a germinação e o aparecimento de formas vegetativas.

A maioria dos fungos são organismos mesófilos, apresentando um crescimento óptimo a temperaturas entre os 25 e os 30°C (Know Mycotoxins, 2008). No entanto, existem fungos com capacidade de crescer a temperaturas entre os 0 e os 35°C, alguns subsistem a temperaturas abaixo dos 0°C, como os pertencentes ao género *Fusarium*, e alguns crescem a temperaturas acima de 35°C, como os pertencentes ao género *Aspergillus spp.* (Oliveira, 2006, p.4). Temperaturas abaixo de -18°C ou acima de 60°C, cessam todo o crescimento fúngico, apesar de alguns esporos serem capazes de sobreviver nessas condições (Martins, 1987, p.18). O quadro 2 esquematiza alguns dos constituintes do Reino Fungi, agrupados de acordo com a temperatura óptima para o seu crescimento.

| Classificação fúngica | Temperatura óptima de desenvolvimento | Exemplos                                                            |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Criófilos             | > -18°C                               | <i>Leveduras do grupo pink</i>                                      |
| Psicrófilos           | -10 a + 3 °C                          | <i>Leveduras</i>                                                    |
| Psicotróficos         | +3 a + 15°C                           | <i>Mucor spp.</i>                                                   |
| Mesófilos             | 37°C                                  | <i>Penicillium spp.</i><br><i>Aspergillum spp.</i>                  |
| Termófilos            | > 37°C                                | <i>Aspergillus fumigatus</i> ,<br><i>Humicola lanuginosa (60°C)</i> |

**Quadro 2. Temperaturas de desenvolvimento óptimo de vários fungos.**

A tensão de O<sub>2</sub> é um parâmetro essencial para a proliferação fúngica, sendo que, valores de anidrido carbónico superiores a 10%, restringem significativamente o crescimento fúngico (Torrado, 2007, p.13). Substratos armazenados com elevados teores de humidade e baixos teores de água activa, constituem uma atmosfera onde algumas leveduras e fungos de armazenamento, como por exemplo o *Aspergillus spp.*, conseguem proliferar.

Os factores físicos incluem também a acção directa de agentes animados ou inanimados sobre as matrizes. O dano mecânico dos grãos de matérias-primas, por exemplo, favorece o desenvolvimento fúngico, uma vez que destrói o tegumento, permitindo o fácil acesso do fungo ao interior do grão (Filho, 2005). A presença de danos mecânicos e danos físicos na planta, devidas à actividade de insectos, pássaros ou outros fungos, ou factores climáticos, como secas ou chuvas intensas, são um veículo de ataque por parte de

fungos e outros invasores, e aumentam enormemente a susceptibilidade da planta em qualquer estado de maturação.

### **2.3.2 Factores químicos**

Os fungos possuem um sistema tamponado no interior das hifas, que lhes permite sobreviver com reduzida sensibilidade ao pH do meio (Torrado, 2007, p.14). Os fungos apresentam capacidade de sobrevivência num intervalo de pH que varia entre 2,5 e 9,5, mas o seu crescimento óptimo dá-se num intervalo de pH entre 5-6 (Universidade Federal do Paraná [UFPR], 2008, p.29).

A natureza do substrato em que os fungos se desenvolvem, varia consoante as necessidades nutritivas de cada espécie. Algumas sobrevivem em substratos muito pobres, como os fungos limosos, enquanto outros necessitam de substratos complexos para o seu desenvolvimento, como os dermatófitos. Os minerais mais importantes para o desenvolvimento fúngico, de um modo geral, são o zinco, o ferro e o cobre, sendo que as concentrações óptimas destes minerais para o crescimento fúngico podem ser determinadas laboratorialmente (Gouveia, 2004).

A capacidade que alguns fungos possuem de se multiplicarem em substratos ricos em açúcares ou sais (UFPR, 2008, p.29), é de grande importância, nomeadamente no controlo de qualidade dos alimentos.

### **2.3.3 Factores biológicos**

Os factores biológicos incluem a actividade de insectos, roedores, ácaros e mesmo mamíferos superiores, na disseminação de espécies micobiotas, principalmente em empresas ou explorações em que os cuidados de higiene não se apresentem correctamente implementados.

A competição microbiana, principalmente a que ocorre entre bactérias e fungos, representa um factor biológico limitante do crescimento fúngico. As bactérias são, sob condições ambientais adequadas, as primeiras a multiplicarem-se em diferentes substratos. Porém, quando as condições ambientais não favorecem o crescimento bacteriano, são os bolores e as leveduras que aproveitam a desvantagem em que os seus competidores se encontram, para proliferarem. Além disso, alguns fungos produzem metabolitos secundários que têm acção inibitória do crescimento bacteriano (Molard, 1986).

## 2.4 Origem das diferentes contaminações fúngicas dos alimentos compostos

A contaminação fúngica final de um determinado produto é cumulativa, sendo o resultado de três tipos de flora fúngica:

**Flora de campo:** Este tipo de flora fúngica inclui micobiotas como o *Fusarium* spp., *Saccharomyces* spp., *Alternaria* spp., e *Clamidosporium* spp. São responsáveis pela contaminação de matérias-primas antes da colheita, em condições de teores de água relativos superiores a 0.95, e geralmente terminam o seu desenvolvimento após a colheita. No entanto, se as condições de armazenamento oferecerem níveis de  $A_w$  adequados, o seu desenvolvimento pode prosseguir (Torrado, 2007, p.16).

**Flora intermediária:** Os géneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* são representantes deste tipo de flora. Estes géneros de fungos desenvolvem-se no período pós-colheita, quando as condições de transporte e armazenamento não são adequadas às regras de qualidade e segurança alimentar, favorecendo o seu desenvolvimento.

**Flora de armazenamento:** Os géneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Absídia*, *Aspergillus*, *Candida* e *Trichoderma* desenvolvem-se em condições de armazenamento com temperaturas médias e  $A_w$  compreendido entre 0.61 e 0.75. Os bolores pertencentes a esta categoria de flora, são os principais responsáveis pela deterioração de cereais e outras matérias-primas (Torrado, 2007, p.16).

O aparecimento das espécies fúngicas como contaminantes de alimentos compostos, depende muito das condições oferecidas para o seu desenvolvimento. As floras intermédia e de armazenamento são as mais preocupantes, uma vez que alteram as propriedades físicas e químicas dos alimentos, incluindo alterações nas características sensoriais e organolépticas, e perda de nutrientes, podendo eventualmente dar-se a produção de micotoxinas. As espécies xerófilas são geralmente as primeiras a proliferar em alimentos armazenados. O seu desenvolvimento, aumenta posteriormente os níveis de humidade e temperatura no substrato, permitindo assim a colonização de espécies mais exigentes ecologicamente (Torrado, 2007, p.17).

## 2.5 Importância da análise micológica

A análise micológica constitui uma parte importante para o controlo da qualidade final do produto. A qualidade é avaliada de acordo com vários factores, sendo que a carga micológica de um produto pode afectar as suas características organolépticas e a

nutritividade do produto final. Características organolépticas desagradáveis são responsáveis por recusa de alimentos, e por perda de nutrientes nos produtos transformados. Estas perdas originam prejuízos económicos muito significativos para os produtores de suínos e para as indústrias de alimentos compostos.

Apesar de não estarem definidos limites máximos recomendados de contaminação fúngica em matérias-primas e alimentos compostos, existe um consenso respeitante aos critérios de qualidade nesses substratos (Laffond-Grellety, 1972), e são apresentados no quadro 3. Estes critérios têm por base dados estatísticos obtidos através de estudos realizados em várias espécies animais, assim como a observação de dados analíticos.

| Classificação dos alimentos compostos | Valores de referência(*)             |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Má                                    | $>8.0 \times 10^5 - 10^6$            |
| Medíocre                              | $>4.0 \times 10^4 - 8.0 \times 10^5$ |
| Razoável                              | $>4.0 \times 10^3 - 4.0 \times 10^4$ |
| Boa                                   | $<1.0 \times 10^3 - 4.0 \times 10^3$ |

**Quadro 3. Valores de referência para classificação de amostras de alimentos compostos, de acordo com os teores micológicos totais encontrados (fonte: Valores de referência adaptados de Laffond-Grellety, 1972); (\*) UFC/g.**

De acordo com os critérios usados por Laffond-Grellety (1972), o limite máximo de contaminação fúngica admitida para alimentos compostos para animais é de  $5 \times 10^4$  UFC/g, já que a maioria das amostras apresentam uma flora fúngica diversificada, com predominância de um ou dois grupos de bolores e grande percentagem de leveduras. Com teores de contaminação fúngica acima de  $10^{7.5}$  UFC/g, os alimentos apresentam características organolépticas anormais, como cheiro a bafio.

A análise dos teores micológicos de uma amostra pode ser complexa, já que pode evidenciar uma carga micológica baixa, mas ser constituída por uma cultura quase pura de uma espécie potencialmente tóxica. Por outro lado, as amostras podem apresentar valores micológicos mais elevados, mas ter uma cultura diversificada.

Em Portugal, os níveis de contaminação fúngica dos alimentos foram analisados ao longo dos anos, como forma de monitorização da sua qualidade.

Em 1987, Martins analisou 404 amostras de rações para suínos, e encontrou teores micológicos médios (TMM) de  $1.4 \times 10^5$  UFC/g. A autora encontrou 83% de amostras contaminadas com *Mucorales*, com 13% dessas amostras a registar valores acima de  $5 \times 10^3$  UFC/g. O género *Penicillium* foi encontrado em 80% das amostras e o género *Fusarium* em 74%, sendo que a maioria das amostras apresentava valores bastante elevados de

contaminação. Estes resultados revelam rações contaminadas com níveis médios acima dos valores de referência recomendáveis, e por isso de qualidade questionável (Martins, 1987, p.145-152).

Num estudo realizado em Portugal em 2001, verificou-se a contaminação de rações para suínos em 18.9% das 106 amostras analisadas, com teores médios de bolores de  $4.9 \log_{10}$  UFC/g, tendo sido os géneros predominantes o *Aspergillus* spp. (70%), *Mucor* spp. (58%), *Penicillium* spp. (54%) e *Fusarium* spp. (24%) (Martins & Martins, 2001).

Um estudo efectuado por Martins no intervalo de 1999 e 2002, no qual 74 amostras de alimentos compostos para suínos foram analisadas, revelaram que os fungos mais comuns foram leveduras, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *A. flavus*, com médias de  $3.2 \log_{10}$ ,  $2.9 \log_{10}$ ,  $2.6 \log_{10}$  e  $2.2 \log_{10}$  UFC/g, respectivamente (Martins, 2003).

Num estudo efectuado em 2007, foram analisadas 75 amostras de alimentos compostos para suínos, das quais 73 (97.3%) se encontravam contaminadas por fungos. Os TMM encontrados foram de  $3.7 \log_{10}$  UFC/g. Os bolores que apresentaram uma frequência mais elevada foram os géneros *Aspergillus* (84.9%) (TMM =  $6.6 \log_{10}$  UFC/g), *Penicillium* (74%) (TMM =  $3 \log_{10}$  UFC/g), *Clamidosporum*, *Mucor* (71.2%) (TMM =  $2.3 \log_{10}$  UFC/g) e *Fusarium* (61.6%) (TMM =  $3.2 \log_{10}$  UFC/g) (Torrado, 2007, p.31).

Num outro estudo efectuado em 2007, 75 amostras do mesmo substrato foram analisadas, e registaram-se 97.3% de amostras contaminadas com fungos (Almeida, Marques, Torrado, & Martins, 2007). A média encontrada de contaminação fúngica foi de  $2.8 \log_{10}$  UFC/g. *Fusarium* spp., *Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp. foram os fungos mais comuns.

## **2.6 Principais fungos contaminantes de alimentos compostos para animais**

A biodegradação de matérias-primas e de alimentos compostos, é um dos principais efeitos deletérios associados à contaminação fúngica, e o conhecimento das características morfológicas e fisiológicas de certas espécies fúngicas, permite o desenvolvimento de medidas preventivas contra o seu desenvolvimento em diferentes substratos. O resume que se segue, foi elaborado no sentido de referir as características associadas a cada uma das principais espécies contaminantes de matérias-primas e alimentos compostos. É importante referir que as características das colónias de fungos variam de acordo com o substrato em que se desenvolvem. As características macroscópicas referidas no texto abaixo (aspecto, textura, forma, pigmentação da superfície anversa e reversa, velocidade de crescimento), ocorrem em meio de cultura Rosa Bengala,

apesar de algumas das fotos se referirem por vezes a culturas em meio de Sabourard, uma vez que as fotografias ficaram mais explícitas neste meio.

### ***Aspergillus spp.***

Os bolores deste género podem ser encontrados no solo, em produtos alimentares, em poeiras, produtos de forragem e matérias em decomposição (Gugnani, 2003), sendo apontados frequentemente como os contaminantes mais comuns de matérias-primas e alimentos compostos. Algumas espécies de *Aspergillus*, como o *Aspergillus fumigatus*, são responsáveis pela doença pulmonar invasiva, infecções disseminadas e infecções no sistema nervoso central em pacientes imunodeprimidos (Latgé, 2001; Rhodes & Brakhage, 2006).

A maioria das espécies são saprófitas e pouco patogénicas para as plantas (Gugnani, 2003), mas as espécies *A. parasiticus* e *A. flavus* destacam-se pela sua capacidade de produzir aflatoxinas em certas colheitas. As aflatoxinas produzem doença e morte em animais e humanos (Gugnani, 2003; Vesonder, Haliburton, Stubblefield, Gilmore, & Peterson, 1991), tendo propriedades hepatotóxicas, teratogénicas, mutagénicas e carcinogénicas (Council for Agricultural Science and Technology [CAST], 1979; Payne, 1992). Estes metabolitos secundários estão implicados em carcinomas hepatocelulares primários em humanos, provocando morte a nível mundial (International Agency for Research on Cancer [IARC], 1984; Li, Yoshizawa, Kawamura, Luo, & Li, 2001), podendo também ser metabolizados e aparecer em excreções de origem animal, como urina, fezes e leite (Peraica, Radić, Lucić, & Pavlović, 1999; Prandini *et al.*, 2009). As aflatoxinas foram encontradas como contaminantes de leite em países como Itália, Espanha e Portugal (Montagna, Napoli, Giglio, Latta, & Barbuti, 2008; Cano-Sancho, Marin, Ramos, Peris-Vicente, & Sanchis, 2010; Martins, Guerra, & Bernardo, 2007).

### ***Aspergillus niger***

Esta espécie foi isolada em matérias-primas e alimentos compostos para suínos (Pereyra, Cavaglieri, Chiacchiera, & Dalcero, 2010; Torrado, 2007, p.31), encontrando-se disseminada no ar e em vegetais em decomposição. São responsáveis por doenças invasivas em humanos (Saubolle, 2000; Wiederhold, Lewis, & Kontoyiannis, 2003), e já foram isolados em lesões nodulares de pulmões de mamíferos (touro, veado, vitelo) (Ainsworth & Austwick, 1973, p.9; Okoye, Gugnani, & Okeke, 1990). Sob condições ambientais apropriadas, apresentam capacidade de produzir ocratoxina A, conhecida pelo

seu potente efeito nefrotóxico, hepatotóxico, teratogénico, carcinogénico e imunossupressor em mamíferos (World Health Organization [WHO], 2002). Relativamente ao seu aspecto macroscópico, os fungos pertencentes a esta espécie são também conhecidos como fungos negros, devido à coloração negra que as suas colónias adquirem à superfície. Esta coloração pertence aos conídeos, que dão à colónia um aspecto granuloso.

### ***Aspergillus flavus***

É considerada a espécie mais comum incluída no género *Aspergillus*, e é contaminante habitual de matérias-primas e alimentos compostos para animais. Coloniza matéria orgânica em decomposição e foi encontrada em alimentos compostos para suínos em Portugal (Torrado, 2007, p.31). Produz um metabolito secundário, a aflatoxina, que apresenta elevada toxicidade e carcinogenicidade (Prado *et al.*, 2011). As suas colónias têm uma textura rugosa, com um pigmento de superfície que varia de amarelo intenso a amarelo esverdeado (figura 3).



**Figura 3. Colónia de *Aspergillus flavus* em meio Sabourard (ao centro), envolvida por colónias de *Fusarium* spp. (fonte: Original, 2011).**

### ***Aspergillus glaucus***

O *Aspergillus glaucus* é uma das espécies mais comuns na natureza, e é um contaminante frequente de alimentos. Apresentam capacidade de multiplicação em condições de privação de água, capacidade de produzir metabolitos secundários, tais como a micotoxina fision, e antibióticos, como a emodina e a rubrocristina (Martins, 1994, p.163-190). As suas colónias apresentam caracteristicamente uma dimensão reduzida, com coloração amarela e o rebordo da colónia esbranquiçado.

### ***Aspergillus terreus***

Esta espécie foi isolada em concentrados destinados à alimentação de aves na Venezuela (Figueroa, Centeno, Calvo, Rengel, & Adelantado, 2009) e em milho analisado em Portugal, destinado ao fabrico de alimentos compostos para suínos (Torrado, 2007, p.31). Este fungo apresenta capacidade de produção da micotoxina patulina. A patulina tem propriedades antibióticas (Bennett & Klich, 2003), mas apresenta toxicidade para plantas e animais, incluindo genotoxicidade (Zhou, Jiang, Geng, Cao, & Zhong, 2010), imunossupressão e carcinogenicidade (Kawashima, 2004, p.110), além de originar doença respiratória em animais e humanos. O pigmento superficial varia de cor de canela a marrom.

### ***Aspergillus candidus***

Esta espécie é também produtora da micotoxina patulina, e é frequentemente encontrada em alimentos compostos para animais (Torrado, 2007, p.31). As colónias apresentam coloração branco puro e uma textura algodonosa/aveludada inicialmente, que se torna granulosa devido à esporulação acentuada.

### ***Fusarium* spp.**

O género *Fusarium* é frequentemente isolado de grãos de cereais (Luca, 2007), e foi isolado em alimentos compostos para suínos em Portugal (Torrado, 2007, p.31). Além dos danos físicos incutidos às matérias-primas e rações, este género afecta a saúde de plantas e animais (Pitt, 2000). Produz micotoxinas como as fumonisinas, os tricotecenos, nivalenol e ZEA (Luca, 2007). As fumonisinas são citotóxicas para várias linhagens de células em mamíferos (Abbas, Shier, Seo, Lee, & Musser, 1998; Sewram *et al.*, 2005), provocam leucoencefalomalácia equina e edema pulmonar em suínos (Caloni & Cortinovis, 2010; Harrison, Colvin, Greene, Newman, & Cole, 1990).



Figura 4. Colónias de *Fusarium* spp. (fonte: Original, 2010).

Foi demonstrado também, o seu poder no aumento dos níveis de proteínas de stress do tracto gastro-intestinal (Lallès, Lessard, Oswald, & David, 2010). A ZEA induz alterações no tracto reprodutivo de suínos e o DON induz emese e recusa alimentar (Sobrova *et al.*, 2010). As suas colónias apresentam aspecto algodinoso, com pigmentação branca, rosa ou cinza (figura 4).

### ***Penicillium spp.***

Os fungos incluídos neste género, representam os segundos mais frequentes em alimentos e são denominados de bolores verdes ou azuis. As suas exigências nutricionais são reduzidas, já que sobrevivem apenas com uma fonte de sais minerais e outra de carbono. Eles dominam a micoflora produtora de toxinas em climas temperados, principalmente em cereais e derivados de carne (Luca, 2007). Análises de alimentos compostos para suínos em Portugal, revelaram contaminação com esta espécie (Torrado, 2007, p.31). Produzem metabolitos secundários, entre eles a penicilina (utilizada como antibiótico), a ocratoxina, a patulina e a citrina. A ocratoxina foi encontrada em várias matérias-primas e alimentos, em todo o mundo (Jørgensen, 2005), sendo tóxica e carcinogénica para os rins (O'Brien & Dietrich, 2004), além de induzir danos hepáticos, quando em elevadas concentrações (Richard, 2007). As colónias deste género apresentam pigmentação verde-azulada, com a periferia branca e o reverso branco. Tem um aspecto único, devido à sua textura aveludada (figura 5).



Figura 5. Colónias de *Penicillium spp.* em meio Sabourard (fonte: Original, 2011).

### ***Mucor spp.***

O género *Mucor* origina a contaminação de colheitas, tanto no campo como no período pós-colheita, principalmente em colheitas danificadas mecanicamente, sendo contaminantes comuns de alimentos compostos para suínos (Torrado, 2007, p.22). São responsáveis por doença em humanos imunodeprimidos ou com traumas (Luca, 2007). As

colónias deste género são densas, de rápido e abundante crescimento, apresentando um micélio aéreo muito desenvolvido. As colónias apresentam cor cinza de intensidade variável, de acordo com a espécie presente (figura 6).

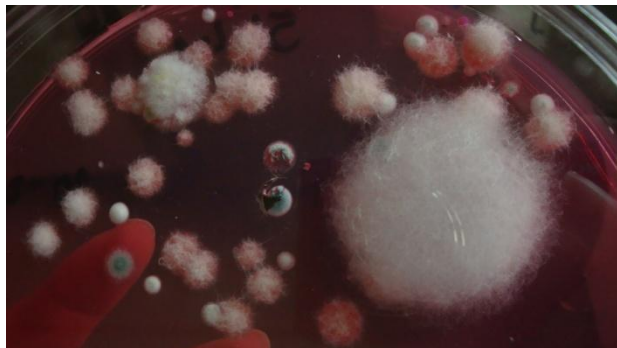


Figura 6. Colónias de *Fusarium* spp. e *Mucor* spp. (fonte: Original, 2011).

### ***Alternaria* spp.**

As espécies pertencentes a este género são importantes patógenos vegetais, sendo que pelo menos cerca de 20% da deterioração de produtos agrícolas é causada pelas mesmas. Existem cerca de 299 espécies pertencentes a este género (Kirk, Cannon, Minter, & Stalpers, 2008), sendo que algumas apresentam a capacidade de produzir compostos tóxicos, que incluem micotoxinas citotóxicas, como o alternariol e o metil ester de alternariol (Ansari & Shrivastava, 1990). A contaminação de alimentos com esta espécie reduz a qualidade, viabilidade e o valor económico e nutricional das colheitas (Rodríguez-Herrera, Waniska, & Rooney, 1999). A superfície das suas colónias é rugosa e os bordos são irregulares, possuindo cor cinza intenso na fase anversa e cor negra na face reversa.

## **3. METABOLITOS SECUNDÁRIOS DOS FUNGOS: AS MICOTOXINAS**

### **3.1 Caracterização das micotoxinas**

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos filamentosos toxigénicos (quadro 4), com a interferência de reacções mediadas por enzimas. São moléculas de peso molecular reduzido e são específicas, geneticamente, de um grupo de espécies dentro de cada género. A sua produção por parte dos fungos é controlada por diversos factores ambientais, como os nutrientes disponíveis, a temperatura, a luminosidade, o pH e a actividade de água (Georgianna & Payne, 2009). As micotoxinas

podem formar-se no final da fase exponencial ou no início da fase estacionária do crescimento do bolor (Gimeno, 2010).

| <b>Micotoxina</b> | <b>Espécies produtoras</b>                                                                                                                        |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aflatoxinas       | <i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>                                                                                                 |
| Ocratoxina A      | <i>Aspergillus ochraceus</i> ; <i>A. alliaceus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. carbonarius</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> ; <i>P. nordicum</i> |
| Tricotecenos      | <i>Fusarium</i> spp.                                                                                                                              |
| Zearalenona       | <i>F. graminearum</i> e outras <i>Fusarium</i> spp.                                                                                               |
| Fumonisinias      | <i>F. moniliforme</i> (= <i>F. verticillioides</i> );<br><i>F. proliferatum</i>                                                                   |

**Quadro 4. Principais espécies fúngicas responsáveis pela produção de micotoxinas (fonte: adaptado de Marques, 2007).**

As micotoxinas, quando ingeridas, são metabolizadas pelo fígado e seguidamente, exercem efeitos deletérios em vários órgãos e sistemas do organismo, demonstrando propriedades tóxicas para animais e humanos (CAST, 2003). Os efeitos tóxicos induzidos pelas micotoxinas, denominam-se de micotoxicoses, e os animais podem ser expostos por via dietética, dermal ou respiratória, entre outras (Bennett & Klich, 2003). A susceptibilidade dos animais à contaminação dos seus alimentos por micotoxinas, depende de vários factores, entre eles factores genéticos, factores fisiológicos e factores ambientais. As micotoxicoses podem ser agudas ou crónicas, sendo que a gravidade depende da concentração de micotoxinas ingerida, a duração da exposição, a sensibilidade do organismo, assim como características específicas da espécie e raça afectada.

Existem 3 formas gerais de caracterizar o efeito das micotoxicoses em animais: micotoxicoses agudas, micotoxicoses crónicas e doenças secundárias às micotoxinas (Pier, Richard, & Cyzewski, 1980). A caracterização destas 3 formas de micotoxicoses encontra-se esquematizada no quadro 5.

Os efeitos desencadeados na saúde de animais e seres humanos são muito variados, uma vez que podem afectar vários órgãos e sistemas, tais como o fígado, os rins, o sistema nervoso, o sistema endócrino e o sistema imunitário. Muitas micotoxinas têm propriedades carcinogénicas, teratogénicas, mutagénicas e hormonais (Torrado, 2007, p.23).

| <b>Tipo de micotoxicose</b>         | <b>Características</b>                                                                                | <b>Sinais Clínicos (exemplos)</b>                                                                              | <b>Dose necessária para provocar micotoxicose</b> |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Primária                            | Sinais marcados de doença ou morte, sinais clínicos dependem da natureza e concentração da micotoxina | Estrogenismo (ZEA)<br>Enterite e emese (DON)                                                                   | Dose alta ou moderada                             |
| Secundária                          | Falta de alterações macroscópicas nos animais afectados, que dificulta o diagnóstico                  | Redução de produtividade, ritmo de crescimento, eficiência reprodutiva, valor de mercado e índice de conversão | Dose moderada a baixa                             |
| Doenças secundárias a micotoxicoses | Imunodepressão;<br>Redução da capacidade de combate a doenças infecciosas.                            | Perdas económicas<br>Vacinações ineficazes<br>Aumento da incidência de doenças infecciosas                     | Dose muito baixa                                  |

**Quadro 5. Caracterização das micotoxicoses primária e secundária, e de doenças secundárias às micotoxinas (fonte: Adaptado de Pier *et al.*, 1980).**

As doses de micotoxinas que são insuficientes para causar quadros agudos de doença, culminam frequentemente no aparecimento de imunodepressão, que pré-dispõe os animais a infecções sub-clínicas, falta de efectividade das vacinações e queda dos seus índices produtivos. Estes efeitos deletérios são responsáveis por perdas económicas muito significativas na indústria suinicultora.

### **3.2 Perspectiva histórica**

O primeiro caso conhecido na história relativo à ocorrência de micotoxicoses, ocorreu na idade média. Nessa época, na Europa, surgiu uma doença caracterizada por sinais clínicos como alucinações, ardência e necrose dos membros anteriores e posteriores em humanos, que foi associada à bruxaria. Hoje sabe-se que esta doença foi provocada pela ingestão de ergolina e ergotamina em cereais contaminados por *Claviceps purpurea*.

O conceito de metabolismo secundário dos fungos ganhou relevância no início do século XX. Foi em 1929, que Alexander Fleming descobriu as propriedades bactericida e bacteriolítica da penicilina, um metabolito secundário produzido por uma espécie de *Penicillium*. Desde então, a penicilina é utilizada no tratamento de infecções bacterianas, até aos dias de hoje. Só 30 anos depois de divulgadas as propriedades da penicilina, foram descobertos novos metabolitos secundários produzidos por fungos.

Em 1961, uma doença denominada de “doença X” dos perus, dizimou milhares de aves em explorações inglesas, tendo sido associada à contaminação dos seus alimentos com aflatoxinas (Bennett & Klich, 2003). O impacto económico desta catástrofe, impulsionou o estudo destes metabolitos, tendo sido a partir daí que surgiu o termo Micotoxicologia.

A ATA (Aleucémia Tóxica Alimentar), foi uma micotoxicose que ocorreu na Rússia no início do século XX (Kuhn & Ghannoum, 2003), sendo considerada uma doença secundária a uma micotoxicose. Esta doença ocorreu devido à ingestão de cereais contaminados com tricotecenos, produzidos pela espécie fúngica *Fusarium sporotrichioides*. A ATA foi responsável por uma elevada taxa de mortalidade, principalmente devido ao desenvolvimento de infecções bacterianas oportunistas em fases mais avançadas da micotoxicose (Butler, 1975; Ciegler, Burmeister, Vesonder, & Hesseltine, 1981; Schiefer, 1986).

### **3.3 Principais micotoxinas contaminantes de alimentos**

Segundo CAST (2003), colheitas de todos os tipos são frequentemente contaminadas com micotoxinas. A mesma fonte estimou que 25 % da alimentação mundial esteja contaminada com estes metabolitos secundários (CAST, 2003).

Apesar da elevada quantidade de micotoxinas catalogadas, apenas algumas são encontradas frequentemente como contaminantes de alimentos. Entre a grande variedade de micotoxinas conhecidas, existem cinco que se encontram com maior frequência em alimentos: deoxinivalenol/nivalenol, zearalenona, fumonisinas, ocratoxina e aflatoxinas (Torrado, 2007, p.23).

Estas micotoxinas foram encontradas em anos anteriores em Portugal, em alimentos compostos para suínos (Martins, Guerra, & Bernardo, 2006; Martins, Marques, Almeida, Guerra, & Bernardo, 2008).

A ocratoxina é responsável por uma doença denominada de nefropatia micotóxica porcina (Golinski, Chelkowski, Grabarkiewicz-Szczesna, & Szebiotko, 1983), além de causar efeito imunossupressor, aumentando a susceptibilidade dos animais a infecções subclínicas

(Veldman, Borggreve, Mulders, & Van De Lagemaat, 1992). Esta micotoxina é um dos metabolitos secundários conhecidos mais tóxicos (Jakić-Dimić, Nešić, & Petrović, 2009).

Outra micotoxina também bastante comum, a fumonisina B1, foi identificada como causa de edema pulmonar e síndrome hepático em suínos (Scott, 1993). O DON afecta a ingestão de alimentos, o peso corporal e tem actividade imunossupressora (Pestka & Bondy, 1990). A ZEA, por sua vez, tem propriedades estrogénicas (Gouveia, Guerra, Martins, & Bernardo, 2005), induzindo problemas graves no tracto reproductivo dos suínos. As aflatoxinas são produzidas por algumas estirpes de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, apresentam propriedades carcinogénicas para os animais e humanos, e interferem no funcionamento do sistema imunitário.

### **3.4 A problemática das micotoxinas**

As micotoxinas representam um problema económico a nível mundial, devido à sua elevada resistência em matérias-primas e em alimentos compostos para animais e humanos, e à dificuldade no seu controlo e eliminação. As micotoxinas apresentam, no geral, uma grande estabilidade química, o que permite a sua persistência no alimento, mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (Oliveira, 2006, p.1). As micotoxinas são bastante resistentes a tratamentos térmicos utilizados no processamento alimentar, como são a cozedura ou congelação (Marques, 2007, p.18), e a sua eliminação dos produtos finais é inviável. Praticamente todo o tipo de alimentos são susceptíveis de serem contaminados durante os processos de produção, processamento, transporte ou armazenagem (Santin, 2005).

As colheitas podem estar contaminadas com várias micotoxinas, uma vez que a maioria dos fungos têm a capacidade de produzir mais que uma micotoxina (Melo dos Santos, Dorner, & Carreira, 2002), além da mistura de metabolitos que ocorre, quando se combinam diferentes matérias-primas para a formulação de alimentos compostos, o que torna a avaliação da exposição a micotoxinas ainda mais complexa (Mirocha & Christensen, 1974). A co-ocorrência de micotoxinas pode ter um efeito sinérgico, antagonista ou aditivo. A interação aditiva ocorre quando diferentes micotoxinas se unem para produzir um efeito e exacerbá-lo, os compostos atuam no mesmo local e com o mesmo mecanismo de ação (Coppock & Christian, 2007). A possibilidade de co-ocorrência de micotoxinas em alimentos suscita preocupações acrescidas, uma vez que é ainda muito limitado o estudo dos efeitos das interações entre estes compostos. Por outro lado, a legislação a nível Europeu apenas divulga valores máximos recomendados, tendo em conta as micotoxinas como presença única nos alimentos. Num artigo elaborado em 2010 na Bélgica, relata-se que 75% das

amostras de alimentos compostos para suínos, trigo e milho estavam contaminadas com mais de uma micotoxina (Monbaliu *et al.*, 2010). Geralmente, os alimentos compostos para animais encontram-se contaminados tanto com ZEA como com DON, e os mecanismos tóxicos destas micotoxinas em conjunto são pouco conhecidos. Sabe-se que ambas inibem a maturação nuclear dos oócitos (Alm, Greising, Brussow, Torner, & Tiemann, 2002). Um estudo recente demonstrou que as micotoxinas ZEA e DON reduzem a fertilidade em suínos, alterando a formação do fuso durante a meiose do oócito. As malformações do fuso induzidas pela micotoxina nos oócitos podem resultar em embriões aneuplóides (Malekinejad *et al.*, 2007). O mesmo estudo concluiu que as duas micotoxinas parecem ter um efeito aditivo, no que diz respeito à sua toxicidade.

Dietas contendo aflatoxinas (AFs) e DON em concentrações mais elevadas do que 60 e 300µg/kg, respectivamente, reduzem o crescimento e a ingestão de alimento, enquanto dietas contendo 120µg de AF/kg e 600µg de DON/kg, resultam em alterações no sistema imunológico, inflamação sistêmica, dano hepático parcial, causando também redução do crescimento (Chaytor *et al.*, 2011).

Um dos perigos mais relevantes associado às micotoxinas, é o da permanência dos seus resíduos em tecidos e produtos de origem animal, como por exemplo, a presença de aflatoxina M1 no leite de bovinos que ingeriram ração contaminada com aflatoxina B1 (Sugiyama, Hiraoka, & Sugita-Konishi, 2008). A transferência de ZEA e DON para os tecidos animais é muito limitada, pelo que os alimentos de origem animal apenas contribuem marginalmente para a exposição de seres humanos a estas micotoxinas (União Europeia, Recomendação (CE) Nº 576/2006 (ANEXO A)).

O diagnóstico das micotoxicoses é difícil para os veterinários, porque existem vários graus de micotoxicose, várias interações entre as diferentes micotoxinas, e cada animal tem condições fisiológicas, nutricionais e genéticas que vão influenciar os sinais clínicos apresentados, pelo que as micotoxicoses são frequentemente sub-diagnosticadas, apesar de a sua importância ser cada vez mais clara. Por este motivo, é difícil estabelecer níveis seguros de micotoxinas na alimentação de animais de produção, já que são tantos os factores que podem influenciar a resposta dos animais à presença da micotoxina na sua dieta.

Por fim, ao serem encontrados níveis não aceitáveis de micotoxinas em matérias-primas ou em rações para suínos, estas devem ser destruídas, uma vez que ainda não possuímos tecnologia que permita a eliminação das micotoxinas dos alimentos sem os destruir.

Por todos os motivos apresentados, parece indiscutível o problema complexo que a contaminação por fungos e micotoxinas apresenta para o sector de produção animal, e consequentemente, para economia nacional.

No início do estudo, definiu-se que as micotoxinas ZEA e DON seriam analisadas, pelos motivos atrás referidos, pelo que de seguida vão ser caracterizadas, para melhor entendimento da sua importância na saúde e bem-estar dos suínos.

### **3.5 Zearalenona**

A ZEA é produzida por várias espécies de *Fusarium*, sendo o *F. graminearum* o mais frequentemente associado à sua produção. É uma micotoxina estrogénica não esteróide, quimicamente descrita como uma lactona do ácido fenólico resorcílico (Vekiru *et al.*, 2010).

O *Fusarium graminearum* foi isolado pela primeira vez no solo de Buckinghamshire, em Inglaterra (Dixon, 1998). A história do estrogenismo e as observações que levaram à descoberta da micotoxina foram descritas por Mirocha, Christensen, & Nelson (1971). Stob, Baldwin, Tuite, Andrews, & Gillette (1962), isolaram uma substância activa de culturas de *Gibberella zeae*, que se sabia provocar uma síndrome estrogénica, quando administrado a ratos. A sua estrutura foi determinada por Urry, Wehrmeister, Hodge, & Hidy (1966).

#### **3.5.1 Biossíntese e propriedades físico-químicas**

A ZEA é um poliquétido sintetizado por condensação da cabeça-cauda de 9 unidades de acetato, via acetato-malonil-coA. A ZEA é estável e não se degrada a altas temperaturas, sendo das micotoxinas melhor estudadas. A fórmula empírica desta micotoxina é  $C_{18}H_{22}O_5$ , correspondendo ao 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)- $\beta$ -ácido resorcílico lactona, cujo peso molecular é 318,147. A representação da sua estrutura encontra-se na figura 7. A ZEA é uma substância branca e cristalizável; solúvel em metanol, éter dietílico, benzeno, acetonitrilo, acetato de etilo e álcoois, sendo insolúvel em água; O seu ponto de fusão é de 165° C; sob luz UV a 366 nm emite uma fluorescência azul (Marques, 2007, p.26).

Bolores do género *Fusarium*, produzem a ZEA em diversas matérias-primas, durante períodos prolongados de frio, elevada humidade, e em épocas de colheita (Zinedine, Soriano, Moltó, & Mañes, 2007). As enzimas responsáveis pela biossíntese de ZEA, são aparentemente induzidas por baixas temperaturas, entre os 12 e os 14°C,

seguidas de uma produção óptima a temperaturas mais altas, de 27°C (Mirocha *et al.*, 1971).

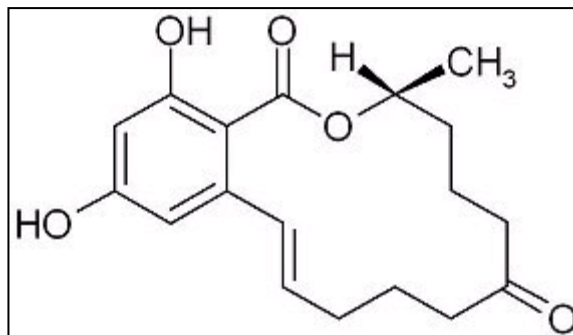


Figura 7. Representação da estrutura química da zearalenona (fonte: European Mycotoxin Awareness Network, 2011).

### 3.5.2 Actividade biológica nos animais

A competição da ZEA e dos seus metabolitos com o 17 $\beta$ -estradiol, por receptores estrogénicos celulares, explica os efeitos anabólicos e estrogénicos observados em diversas espécies (Diekman & Green, 1992). A ZEA apresenta maior potencial estrogénico quando comparada com o 17 $\beta$ -estradiol, devido ao seu modo de acção e ao tempo de permanência no núcleo das células (Gaumy, Bailly, Burgat, & Guerre, 2001).

As espécies animais apresentam diferentes susceptibilidades à ZEA, de acordo com diferenças no seu metabolismo hepático e extra-hepático, que é catalizado por hidrogenases hidroxisteróides (Malekinejad, Maas-Bakker, & Fink-Gremmels, 2005).

Duas vias de biotransformação foram sugeridas, em animais: hidroxilação resultante na formação de  $\alpha$ -ZEA ( $\alpha$ -zearalenol) e  $\beta$ -ZEA ( $\beta$ -zearalenol), que se assume ser catalizada pelas 3 $\alpha$ - e 3 $\beta$ -hidroxisteroide desidrogenases (HSDs) ou conjugação da ZEA e dos seus metabolitos reduzidos com o ácido glucorónico, catalizado pela uridina difosfato glucuronil transferase (UDPGT) (Zinedine, Soriano, Moltó, & Mañes, 2006).

A sua metabolização no fígado origina 2 metabolitos, o  $\alpha$ -zearalenol e o  $\beta$ -zearalenol (figura 8), tendo o  $\alpha$ -zearalenol uma actividade muito mais potente que a ZEA ou o  $\beta$ -zearalenol (Malekinejad, Maas-Bakker, & Fink-Gremmels, 2005). A produção predominante de  $\alpha$ -zearalenol em suínos, associada à maior afinidade desse metabolito pelos receptores estrogénicos, justifica a alta sensibilidade da espécie à micotoxina (Malekinejad, Maas-Bakker, & Fink-Gremmels, 2006).

Tanto a ZEA como os seus derivados, o  $\beta$ -zearalenol e o  $\alpha$ -zearalenol, foram utilizados como promotores de crescimento em animais de carne, devido precisamente aos seus efeitos estrogénicos e anabolizantes. No entanto demonstrou-se que, para além disso, estes derivados têm efeitos carcinogénicos (Marques, 2007, p.29). Além de carcinogénica, a ZEA tem efeitos hepatotóxicos, hematotóxicos, imunotóxicos e genotóxicos (Zinedine *et al.*, 2007).

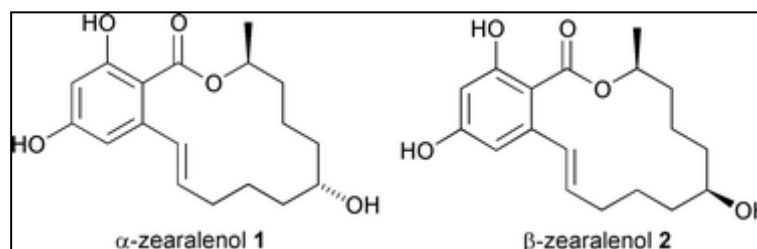


Figura 8. Estruturas químicas dos derivados da zearalenona,  $\alpha$ -zearalenol e  $\beta$ -zearalenol (fonte: Marques, 2007, p.26).

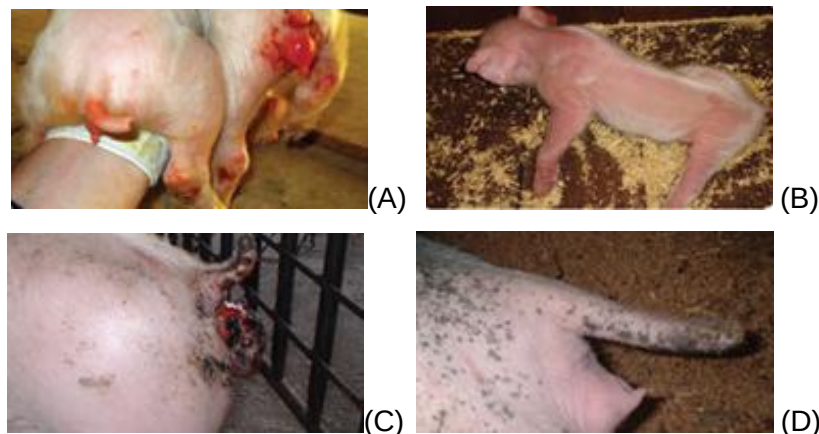
A ZEA é responsável por múltiplas alterações no organismo, mas os seus efeitos destacam-se mais frequentemente associados a problemas do tracto reprodutivo (figura 9). As fêmeas jovens, parecem ser as mais sensíveis a afecções induzidas pela ZEA (Jakimiuk *et al.*, 2010). Foram reportados sinais clínicos como edema da vulva, do útero e dos mamilos, prolapso vaginal e infertilidade em porcas sujeitas a uma alimentação contaminada com ZEA (Aoyama, Ishikuro, Nichiwaki, & Ichinoe, 2009). Estas alterações dão-se pelo estímulo dos receptores estrogénicos citoplasmáticos, que incrementa a síntese proteica no aparelho reprodutor, provocando o aumento da secreção das células endometriais, aumento da síntese das proteínas uterinas, que por sua vez, levam ao aumento do peso do tracto reprodutivo. Estas alterações podem levar à pseudogestação pela manutenção do corpo lúteo, resultando em quadros clínicos de vulvovaginite, leitões fracos e natimortos, além de quadros de *splayleg* (figura 9), marcada redução das taxas de concepção e repetição deaios (Malekinejad *et al.*, 2006).

A ZEA induz hepatomegália e nefromegália, aumento dos níveis de AST (aminotransferase), ALP (alanina aminotransferase), GGT ( $\gamma$ -glutamato transferase), ureia, creatinina e MDA (malondialdeído), no soro e no fígado (Jiang *et al.*, 2011).

Os leitões são expostos às micotoxinas através da ingestão de leite, quando as suas progenitoras se alimentaram com alimentos contaminados com estes metabolitos (Dänicke *et al.*, 2007). A intoxicação mimetiza o estro, e os leitões recém-nascidos podem apresentar vulvovaginite infantil. Ocorre um decréscimo na sobrevivência embrionária e decréscimo do peso fetal, em porcas alimentadas com comida contaminada com altos níveis

de ZEA (Etienne & Dourmad, 1994). Foram observadas alterações no desenvolvimento tanto dos folículos ovários, como dos embriões já formados (Tiemann & Dänicke, 2007).

Em suínos machos, os sinais clínicos incluem atrofia testicular, hipertrofia das glândulas mamárias (Aoyama *et al.*, 2009), edema do prepúcio, diminuição da libido e efeminização dos animais (CAST, 2003).



**Figura 9.** Sinais clínicos em suínos com micotoxicose induzida por zearalenona (fonte: Voorsluys, 2010); A: Edema e hiperemia da vulva em leitoas; B; *Splayleg* em suínos recém-nascidos; C: Prolapso vulvar; D: Edema vulvar.

### 3.6 Deoxinivalenol

O DON é uma micotoxina pertencente à família das tricocenas do tipo B, e é produzida pelos fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* (Diesing *et al.*, 2011). Estão descritas mais de 180 tricotecenas (Malekinejad *et al.*, 2007), sendo o DON e o nivalenol os mais frequentemente encontrados em cereais como trigo, centeio, aveia, cevada e milho, existindo relatos de contaminação a nível mundial (Binder, Tan, Chin, Handl, & Richard, 2007; Driehuis, Spanjer, Scholten, & Te Giffel, 2008).

Em 1972, um grupo de investigadores elucidou, pela primeira vez, o papel das tricotecenas como agente etiológico das micotoxicoses, demonstrando o papel da toxina T-2, produzida pela espécie *Fusarium tricinctum* em milho contaminado, na doença e morte de vacas (Hsu, Smalley, Strong, & Ribelin, 1972). O metabolito foi, mais tarde, isolado e caracterizado por Yoshizawa e Morooka, em cevada contaminada com fungos, no Japão (Yoshizawa & Morooka, 1973).

Esta micotoxina, e outras produzidas por fungos, foram implicadas na doença ATA, que ficou conhecida por provocar hemorragias severas, leucopénia, angina necrótica e degeneração da medula óssea (Ueno, 1977).

### 3.6.1 Biossíntese e propriedades físico-químicas

As tricotecenas são constituídas por um núcleo tricíclico denominado de tricotecena, e normalmente contém um epóxido no C-12 ou C-13, que é essencial à sua toxicidade. A sua estrutura química é variável de acordo com o número, posição e complexidade das esterificações, assim como pelo número de hidroxilações (Marques, 2007, p.22).

As tricotecenas de *Fusarium* são álcoois relativamente simples e estéreis de cadeia curta. A sua biossíntese origina-se de um produto natural, denominado de tricodieno. Este tricodieno origina-se da incorporação de  $Mg^{2+}$  no composto farnesil-difosfato.

A fórmula empírica do DON é  $C_{15}H_{20}O_6$ , sendo o seu nome químico 12,13-epoxy-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15-trihydroxytrichothec-9-en-8-on (Nagy, Fejer, Berek, Molnar, & Viskolcz, 2005). É solúvel em acetonitrilo - água (90-10); emite fluorescência acastanhada sob luz UV de 260 nm e funde a 152°C. A figura 10 esquematiza a estrutura do DON.

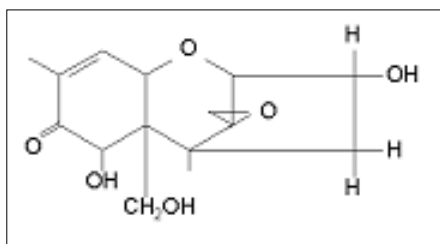


Figura 10. Representação da estrutura química do deoxinivalenol (fonte: Purdue University, 2001).

Para que haja produção de DON, a temperatura é essencial, devendo variar entre os 15 e os 30°C, sendo a temperatura óptima de 28°C (Marques, 2007, p.24). Temperaturas abaixo de 21°C e chuva intensa são dois factores que favorecem a contaminação das colheitas. O DON é muito estável a altas temperaturas, entre 170 e 350°C, sendo esta uma das suas propriedades físico-químicas mais importantes, aumentando muito o risco da sua permanência em alimentos (Hughes, Gahl, Graham, & Grieb, 1999).

### 3.6.2 Actividade biológica nos animais

Os suínos foram identificados como sendo a espécie mais sensível ao DON (Pestka, 2007), seguidos dos roedores, cães, gatos, aves e ruminantes (Pestka & Smolinski, 2005; Rotter, Prelusky, & Pestka, 1996; Trenholm, Hamilton, Friend, Thompson, & Hartin, 1984).

A toxicidade associada ao DON é causada pela inibição da síntese proteica, através da sua ligação aos ribossomas (Pestka & Smolinski, 2005; Rotter *et al.*, 1996). Os tricotecenos são micotoxinas fortemente citotóxicos para as células eucarióticas (Marques, 2007, p.24), com potente acção inibidora na síntese de ARN (ácido ribonucleico) e ADN nas paredes celulares.

Esta micotoxina exerce efeitos inflamatórios, induzindo a expressão de citocinas e quimiocinas nos fagócitos mononucleares (Nasri, Bosch, Voorde, & Fink-Gremmels, 2006; Pestka, Zhou, Moon, & Chung, 2004; Zhou, Jia, & Pestka, 2005).

As alterações inflamatórias ocorrem particularmente no tracto gastrointestinal, dificultando o transporte de nutrientes e resultando numa redução do ganho de peso (Malekinejad *et al.*, 2007). Doses mais elevadas de DON, resultam em efeitos eméticos, e doses mais reduzidas contribuem para a redução da ingestão de alimento, diminuindo o crescimento e a performance destes animais (Malekinejad *et al.*, 2007). A exposição dos suínos ao DON, em conjunto com a exposição a agentes infecciosos, aumenta a sua sensibilidade ao DON, devido à resposta inflamatória concomitante que ocorre (Pestka & Zhou, 2006). O DON contribui para a perda da função da parede intestinal, responsável pela primeira barreira contra as micotoxinas no organismo, através do decréscimo da expressão da proteína claudina-4 (Pinton *et al.*, 2010). Um estudo realizado em 2007, revelou que, níveis de DON de 2.8 mg/kg, administrados a 24 suínos, num período de 4 semanas, reduziu significativamente o ganho de peso destes animais e teve um efeito moderado nas bactérias intestinais, o que sugere alterações significativas na dinâmica da comunidade intestinal bacteriana destes animais (Waché *et al.*, 2009).

Foi reportado também, que o DON reduz a taxa de síntese fraccionada de albumina e linfócitos (Goyarts, Grove, & Danike, 2006). Em suínos, a ingestão de 2 a 5 mg de alimentos contaminados com DON/kg aumenta a regulação de IgA (Imunoglobulina A) em soro (Bergsjø, Langseth, Nafstad, Jansen, & Larsen, 1993; Dänicke *et al.*, 2004). Foram observadas respostas imunes retardadas, uma ou duas semanas depois da imunização, em suínos a quem foram administrados 3 mg de DON por kg de ração (Rotter, Thompson, Lessard, Trenholm, & Tryphonas, 1994). Suínos alimentados com 2.2-2.5 mg de DON/kg de ração durante 9 semanas, e imunizados subcutaneamente com ovalbumina, revelaram uma alteração significativa na resposta imunitária global e específica. No referido estudo, foi observado um aumento das concentrações de IgA e IgG (Imunoglobulina G) específicas para a ovalbumina, tendo sido registados decréscimos de citocinas nos linfonodos mesentéricos. O estudo concluiu que o DON afecta a imunidade vacinal em suínos, podendo levar à ocorrência de doença em animais apropriadamente vacinados (Pinton *et al.*, 2008).

Ocorre também hepatomegalia, hipoproteinemia e hipoalbuminemia séricas, assim como a redução temporária do volume sanguíneo, cálcio e fósforo séricos (Bergsjö *et al.*, 1993).

Com valores de 9 mg de DON/kg de ração, a síntese proteica e a resposta imune humoral e celular sofrem alterações, sendo as estruturas celulares do fígado e do baço também afectadas. Foram observadas também alterações reprodutivas, incluindo o decréscimo do desenvolvimento de oócitos e embriões (Tiemann, & Dänicke, 2007).

Um estudo recente refere que a exposição aguda ao DON apresenta um potencial hepatotóxico, imunotóxico e induz apoptose dos linfócitos nos órgãos linfóides, com exposição aguda em suínos (Mikami, Yamaguchi, Murata, Nakajima, & Miyazaki, 2010).

### **3.7 Co-ocorrência de ZEA e DON**

Os efeitos da alimentação de porcas reprodutoras, com grãos naturalmente contaminados com uma combinação de micotoxinas: 5.5mg/kg de DON, 0,5 mg/kg de DON 15-acetil, e 0,3 mg/kg de ZEA, resultou em reduzido ganho de peso vivo, aumento da taxa de nados mortos, redução da ingestão alimentar, aumento das perdas de peso corporal e prolongamento do intervalo inter-estros (Díaz-Llano & Smith, 2006; Díaz-Llano & Smith, 2007).

Animais alimentados com rações contaminadas com ZEA e DON revelaram, histologicamente, disfunções a nível hepático e esplénico. Animais em período pré-puberal, revelaram-se mais sensíveis aos efeitos destas micotoxinas, relativamente a porcas gestantes. Apesar de a ZEA afectar a performance reprodutiva de uma forma mais directa, o DON afecta a reprodução dos suínos de forma indirecta, através da redução da ingestão de alimentos, o que resulta em redução do ganho de peso e diminuição da performance de órgãos vitais, como o fígado e o baço (Tiemann & Dänicke, 2007).

Um estudo publicado em 2008, demonstra que níveis de contaminação de 1 mg/kg de DON e 250 µg/kg de ZEA, causam hipoproteinemia, hipoalbuminemia e hipoglobulinemia séricas, entre muitas outras alterações observadas. Histologicamente, com as mesmas doses, foram demonstradas anomalias hepáticas, esplénicas, nos linfonodos, útero e rins (Chen *et al.*, 2008).

### **3.8 Controlo das micotoxinas**

O ponto mais importante para o controlo de micotoxinas é, sem dúvida, a prevenção, já que a sua eliminação do produto final é muitas vezes inviável ou impossível. A

aplicação de protocolos de prevenção e controlo destes metabolitos, ajuda a reduzir a sua ocorrência para níveis de contaminação aceitáveis. O fabrico de alimentos compostos, conta com a aplicação de sistemas HACCP em todas as fases de produção, sendo uma parte essencial desses sistemas a análise micológica e micotoxicológica dos alimentos. O controlo micológico e micotoxicológico de alimentos compostos para animais, protege a saúde e bem-estar destes, evita a perda de nutrientes essenciais, o aparecimento de características organolépticas indesejáveis e a produção de metabolitos tóxicos nos alimentos.

A micologia e micotoxicologia alimentar têm uma importância fundamental para a segurança alimentar, já que permitem o estudo das condições em que os fungos e as micotoxinas se desenvolvem, permitindo a criação de medidas preventivas contra estes. Permitem, por outro lado, a sua correcta identificação e quantificação, permitindo a destruição de alimentos desadequados ao consumo animal e humano. Existem neste momento, métodos de pesquisa e quantificação destes metabolitos de elevada sensibilidade, que podem ser de grande utilidade no controlo sanitário de alimentos para humanos e animais.

A implementação de práticas adequadas de colheita e armazenamento de matérias-primas, assim como a escolha do momento ideal para a colheita, são muito importantes, uma vez que as culturas tardias tendem a ter maiores probabilidades de serem contaminadas com micotoxinas. As culturas de cereais e sementes de oleaginosas devem sofrer secagem imediatamente após a colheita.

Uma forma eficaz de controlar o crescimento fúngico, é através da manipulação do microambiente onde os géneros alimentícios são armazenados. Se for oferecido um microambiente desfavorável ao crescimento destes microorganismos e à produção de micotoxinas, a sua ocorrência será reduzida. O controlo do microambiente é a medida mais eficiente e barata que pode ser aplicada no controlo da proliferação fúngica. Para isso, basta aplicar boas práticas agrícolas, como seleccionar sementes descontaminadas, aplicar medidas de controlo de insectos, roedores, entre outras (Mallmann, 2006), já que muitas micotoxinas se formam ainda durante o período de crescimento das plantas, no campo. Agentes anti-fúngicos podem ser utilizados, mas sempre como complemento de boas práticas agrícolas (CAST, 2003).

Os materiais que entram em contacto com as colheitas durante o transporte, devem ser limpos previamente, para evitar a sua contaminação.

A engenharia genética tem oferecido desenvolvimentos muito relevantes, já que o genoma das plantas tem muita influência na sua contaminação fúngica e micotóxica. Sendo assim, cada vez mais irão ser produzidas plantas cujos genomas conferem maior resistência a estas pragas. Dilkin, Mallmann, & Santurio (2000), avaliaram cinco tipos de híbridos de

milho e concluíram que híbridos diferentes apresentam diferenças muito significativas no que diz respeito ao potencial de produção de micotoxinas.

Os ácidos orgânicos podem também ser utilizados no controlo do crescimento de microorganismos. Estes reduzem o pH do meio, tornando-o assim impróprio para o crescimento fúngico (Krabble, Penz, Lazzari, & Reginatto, 1994). Estes ácidos dissociam-se no interior das células, acidificando o citoplasma, o que resulta na inibição do transporte de nutrientes. Os fungos elevam posteriormente o consumo de energia, na tentativa de manter o pH homeostático. Ocorre assim um estreitamento da faixa de pH, o que promove a inibição celular, acabando por levar à perda de capacidade de desenvolvimento dos fungos. É comum a utilização de um conjunto de ácidos orgânicos - ácido propiónico, ácido acético, ácido benzóico e o ácido sórbico - que forma um complexo tamponado. Este complexo dissocia-se na presença de humidade, libertando o ácido propiónico, que promove então a inibição fúngica (Krabble *et al.*, 1994).

Existem vários métodos de descontaminação de matérias-primas e alimentos compostos para animais, apesar de apresentarem uma eficácia duvidosa. Existem métodos físicos, químicos, adsorventes e microbiológicos. A maioria das micotoxinas é quimicamente estável, e resistem às condições de processamento, como por exemplo, temperaturas elevadas.

Temperaturas em torno de 150 a 220°C reduzem 87 a 100% a concentração de fumonisina B<sub>1</sub> em grãos de milho, mas esta temperatura altera a constituição nutritiva das rações (Dupuy, Le Bars, Boudra, & Le Bars, 1993). A lavagem de grãos com água e solução de carbonato de sódio, revelou uma diminuição de DON, ZEA e fumonisina em milho (Voss, Bacon, Meredith, & Norred, 1996). O problema surge pela inviabilidade de aplicação, quando se trata de uma grande quantidade de rações a serem tratadas, como acontece nas fábricas de alimentos compostos.

O DON pode ser reduzido através de processos de moagem, e a ZEA, assim como os tricotecenos, podem ser reduzidos através de separação por densidade (Mallmann, 2006).

Os métodos químicos podem ser aplicados através da utilização de ácidos, bases, aldeídos, agentes oxidantes e gases. Estes agentes vão degradar ou inativar as micotoxinas. Estes métodos são no entanto considerados pouco práticos e seguros, podendo alterar os níveis nutricionais e o paladar dos alimentos (Park, Lee, Price, & Pohland, 1988).

Os processos biológicos passam pela utilização de bactérias ou processos fermentativos. Foi observada a diminuição dos níveis de DON em grãos de trigo que sofreram processos de fermentação e processos térmicos. Este evento pode estar

associado à capacidade das leveduras de adsorver as micotoxinas, reduzindo assim a contaminação total. Vários estudos comprovam a eficácia dos processos de fermentação no combate às micotoxinas: a utilização de *Bacillus* spp., *A. Flavus/A. parasiticus* e *Trichoderma* spp., reduziram a contaminação em 98%, 90% e 75%, respectivamente (Mallmann, 2006).

O uso de adsorventes tem a vantagem da facilidade de utilização, e de não exigir nenhum equipamento especial para a sua aplicação. Eles são utilizados para reduzir a absorção de micotoxinas pelo aparelho digestivo de suínos e aves. São utilizadas argilas seleccionadas e processadas, sendo o seu custo geralmente elevado e a sua eficiência reduzida. Por outro lado, os adsorventes que resultam na adsorção de uma micotoxina, podem apresentar limitações na adsorção de outro tipo de micotoxina, sendo que algumas micotoxinas não são eficazmente adsorvidas, como as fumonisinas, DON, T-2 e ocratoxinas (Kubena, Harvey, Baylei, Buckley, & Rottinghaus, 1998). Por outro lado, estes minerais possuem a capacidade de adsorver outros constituintes das rações formuladas para suínos, tais como minerais, vitaminas, promotores de crescimento e coccidiostáticos, tornando os animais mais sensíveis a doenças infecciosas (Shryock, Klink, & Readnour, 1994).

No combate aos agentes fúngicos, são utilizados produtos químicos, orgânicos ou inorgânicos, que actuam como desinfectantes de superfícies, plantas, animais e solos.

Para cada ecossistema referido, estão disponíveis produtos fungicidas adequados à prevenção ou tratamento de contaminações fúngicas, alguns com acção tóxica para animais e manipuladores. Cada grupo de fungicidas actua sobre os fungos de forma directa, perturbando a permeabilidade celular e os metabolitos protoplasmáticos, ou de forma indirecta, interferindo nos sistemas de assimilação de nutrientes extracelulares (Lacaz, Minami, & Purchio, 1970).

As doenças fúngicas que ocorrem nas plantas são combatidas com derivados cúpricos, como o sulfato de cobre, ou mercuriais, entre outros fungicidas sulfurados inorgânicos. Quanto aos fungicidas orgânicos, são utilizados diversos compostos heterocíclicos nitroaromáticos, halogenados e outros, utilizados em concentrações baixas, variando entre 0.5 a 2%. O formol a 1-2%, assim como os compostos fenólicos, são empregados na desinfecção de parques, pavilhões, superfícies e laboratórios.

### **3.9 Legislação**

O reconhecimento dos riscos associados à ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas, é aceite em todo o mundo industrializado, e torna evidente a importância dos estudos efectuados nesta área, assim como dos mecanismos legais que asseguram a

segurança dos alimentos. A legislação impõe limites quanto às concentrações de micotoxinas que podem estar presentes em matérias-primas e em alimentos compostos, sendo através deste processo que o Governo Nacional e as organizações internacionais garantem a segurança dos alimentos.

A aplicação de medidas de controlo, como a análise de perigos e pontos críticos de controlo, tornam possível a diminuição dos níveis de micotoxinas nos alimentos. O HACCP assenta na suposição de que boas práticas de higiene, fabrico e armazenamento, resultam na obtenção de produtos finais com perigos controlados. Para que este sistema funcione, é necessário o conhecimento profundo das condições de produção dos vários fungos e micotoxinas, a fim de proporcionar microambientes durante as várias fases de produção, que reduzam a sua ocorrência. Neste contexto, o controlo de micotoxinas nas matérias-primas que serão utilizadas para formular rações compostas para animais, deve ser um pré-requisito do sistema HACCP.

Os níveis máximos admitidos de micotoxinas em alimentos dependem muito da condição geográfica, económica e política, assim como, do nível de industrialização e características agronómicas de cada país. Os países sem produção própria de determinado alimento têm, geralmente, uma exigência mais elevada relativamente a países onde os produtos são produzidos. Consequentemente, sinais clínicos de micotoxicoses associadas a alimentos, são mais comuns em zonas produtoras e exportadoras, e menos comuns em países importadores com regras mais restritas.

A regulamentação das micotoxinas está condicionada a diversos factores, que incluem a disponibilidade de métodos analíticos de controlo e de dados toxicológicos, a existência de dados sobre a ocorrência de micotoxinas nos vários alimentos, a homogeneidade da distribuição das micotoxinas nas matrizes alimentares, a legislação noutros países com os quais existam contactos comerciais e a necessidade de alguns países em garantirem o abastecimento de alimentos em quantidade suficiente.

Estudos efectuados pelo *Scientific Committee on Food* relativamente à toxicidade do DON e da ZEA revelaram-se extremamente importantes para avaliar a perigosidade destas micotoxinas quando presentes em alimentos ou rações animais. Contudo, as investigações realizadas demonstram resultados contraditórios e não permitem estabelecer um limite abaixo do qual não sejam observados efeitos nocivos, pois existe uma vasta gama de variáveis a ter em conta.

Não é possível, pelo menos actualmente, impedir ou eliminar totalmente a proliferação de fungos, pelo que a presença de micotoxinas em alimentos produzidos e armazenados continua a ser um perigo real. Para exercer controlo sobre esse perigo, é

necessário estabelecer limites tão baixos quanto possíveis (Comunidade Europeia, Regulamento (CE) Nº 466/2001).

Esses limites foram então estabelecidos pela Comissão da União Europeia, com base na Recomendação Nº 576, da Comissão de 17 de Agosto de 2006 que estabelece valores de orientação para alimentos compostos para suínos (ANEXO A).

No quadro 6, apresentam-se esses valores de orientação para as micotoxinas ZEA e DON, relativamente a alimentos compostos para suínos.

| Micotoxina     | Produtos destinados a alimentação de Suínos                                       | Valores guia em mg/kg                                                 |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|                |                                                                                   | (ppm) relativos a alimentos para animais com teor de humidade de 12 % |
| Zearalenona    | Alimentos complementares e completos para leitões e porcas jovens                 | 0.1                                                                   |
|                | Alimentos complementares e completos para porcas reprodutoras e porcos de engorda | 0.25                                                                  |
| Deoxinivalenol | Alimentos complementares e completos para suínos                                  | 0.9                                                                   |

**Quadro 6. Guia de níveis máximos aceitáveis de micotoxinas em alimentos compostos para suínos (fonte: União Europeia, Recomendação (CE) Nº 576/2006).**

Os lotes de matérias-primas ou alimentos compostos, cujos níveis de contaminação com micotoxinas sejam superiores ao limite máximo admitido, devem ser destruídos.

#### **4. APARELHOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICOTOXINAS**

A detecção e quantificação de micotoxinas são executadas, recorrendo a métodos analíticos adequados à finalidade a que se destinam. Esta detecção e quantificação em alimentos é essencial para gerir e controlar os níveis de micotoxinas nos produtos alimentares. Os métodos cromatográficos são os mais populares na detecção e quantificação destes metabolitos secundários, em particular a cromatografia em camada fina (TLC) e a cromatografia líquida de alta performance, ou a cromatografia gasosa (GC). Alternativamente, as técnicas imunoenzimáticas são utilizadas quando se pretende

um resultado mais rápido e de um grande número de análises. Seguidamente, encontra-se um resumo de algumas das técnicas mais utilizadas na detecção e quantificação de micotoxinas, incluindo as principais vantagens e desvantagens associadas a cada método.

#### **4.1 Técnicas imunoenzimáticas**

O enzimoimunoensaio (EIA) competitivo é uma técnica que se baseia numa reacção de competição, que ocorre entre as moléculas eventualmente presentes na amostra, com outras que são adicionadas de forma controlada e que se encontram marcadas, estando unidas a anticorpos. Partindo do princípio que ambas têm a mesma afinidade, quanto maior for a contaminação da amostra, mais moléculas não marcadas se vão unir ao anticorpo.

O EIA conta com duas técnicas, a homogénea, onde ocorre a separação dos reagentes, e a heterogénea, na qual se verifica a separação entre o imuno-complexo e a matéria que não reagiu. A ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é uma técnica de EIA heterogénea. Neste método, o reagente, que pode ser um antigénio ou um anticorpo, é imobilizado numa fase sólida, adicionando-se depois a solução-teste da micotoxina e a enzima marcada, com um antigénio ou um anticorpo. Após a incubação, faz-se uma lavagem que elimina o material livre que não reagiu e contabiliza-se a quantidade de enzima ligada à fase sólida, pela adição de um substrato cromogénico. Quanto maior for o número de moléculas de micotoxina existentes na amostra, menor é o número de moléculas conjugadas à peroxidase que se irão unir ao anticorpo. A cor desenvolvida pela acção da peroxidase sobre o substrato que posteriormente se adiciona será inferior (Egmond, 1989).

Estas técnicas são muito utilizadas na indústria, como por exemplo nas fábricas de processamento de produtos lácteos, que as utilizam para testar grandes lotes de produtos. Actualmente estão disponíveis no mercado *kits* comerciais com sensibilidade adequada à pesquisa de aflatoxina M1 em lacticíneos.

Este método permite a fácil identificação dos compostos presentes, sendo altamente específico (Turner, Subrahmanyam, & Piletsky, 2009). Apresenta um custo reduzido e é fácil de aplicar (Goryacheva, De Saeger, Eremin, & Van Peteghem, 2007). A possibilidade de se poder processar ao mesmo tempo um número elevado de amostras, usando microplacas é outra das vantagens atribuídas a este método.

Como desvantagens deste método, conta o facto de uma amostra positiva ter de ser confirmada através de outro mais sensível, já que pode ocorrer reactividade cruzada com anticorpos secundários, o que pode resultar num sinal não-específico (Turner *et al.*,

2009). Outra desvantagem apresentada é o facto de cada kit só poder ser utilizado uma vez, o que aumenta os custos no caso de ser necessário um grande número de análises.

#### **4.2 Cromatografia Líquida de Camada Fina**

A cromatografia líquida de camada fina usa a adsorção como processo separativo, e uma fase estacionária sólida que forma um revestimento fino de uma placa plana metálica, que serve de suporte. O procedimento mais usado é pressionar os cilindros de agar contra a placa de TLC, secar e correr com fase móvel. O TLC permite a separação dos compostos presentes numa amostra, de acordo com as suas afinidades para com a fase móvel e a fase estacionária. Para a aquisição de um cromatograma de forma correcta, este é realizado em câmara fechada, para a estabilização de vários parâmetros experimentais, como a temperatura, evaporação do eluente, composição e grau de saturação da atmosfera em contacto com o meio cromatográfico. Estes factores são muito importantes para facilitar a cromatografia. O factor de retenção ( $R_f$ ), dado pela razão entre a distância em centímetros migrada pelo composto, e a distância total migrada pelo solvente, assim como pela cor dos metabolitos a diferentes comprimentos de onda, permite a identificação dos compostos. A identificação dos compostos presentes é feita de acordo com bases de dados, de acordo com o  $R_f$  e a cor dos metabolitos (Paterson & Bridge, 1994).

As principais vantagens do TLC são a sua rapidez e a capacidade de analisar várias amostras de uma vez, de forma económica (Turner *et al.*, 2009), além da capacidade de detecção simultânea de várias micotoxinas. As principais limitações são o limite de detecção relativamente elevado, a falta de precisão e quantificação limitada. Por outro lado, esta técnica exige procedimentos de preparação da amostra de acordo com o tipo e as propriedades da micoxina a analisar, que podem ser complexos.

As limitações do TLC são ultrapassadas com a análise dos metabolitos por HPLC.

#### **4.3 Cromatografia Gasosa (CG)**

A cromatografia gasosa é utilizada para detecção de micotoxinas em alimentos, sendo frequentemente utilizada em combinação com técnicas de detecção como MS (*mass spectrometry*), FIR (*flame ionisation detector*) ou FTIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*), que permitem a detecção de produtos voláteis (Onji *et al.*, 1998; Suzuki, Kurisu, Nose, & Watanabe, 1981; Young & Games, 1994).

As micotoxinas não são voláteis, constituindo assim um problema inicial para a utilização deste método (Scott, 1995). No entanto, vários trabalhos foram já publicados (Jiao, Blaas, Ruhl, & Weber, 1992; Scott, 1995), e descrevem a utilização desta técnica para a quantificação de micotoxinas. Para tal, são utilizadas reacções químicas como silição ou polifluoroacililação, para obtenção de compostos voláteis. O método GC-MS (Cromatografia Gasosa – Espectrometria em Massa) permite a análise de até 4 compostos simultaneamente, em apenas 23 minutos (Turner *et al.*, 2009).

No entanto, não é uma técnica utilizada comercialmente, devido à existência de técnicas muito mais económicas e rápidas, como o HPLC (Turner *et al.*, 2009). Como desvantagens, este método apresenta o facto de que apenas substâncias voláteis ou volatilizáveis podem ser analisadas, além de que, o processo de aquecimento que induz a volatilização, pode provocar a destruição de algumas moléculas. Algumas substâncias são evaporadas pelo calor do injectador, antes de serem medidas.

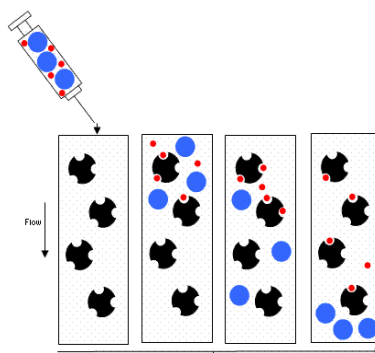
#### **4.4 Cromatografia Líquida de Alta Performance**

A técnica para detecção e quantificação de micotoxinas mais utilizada neste momento é a cromatografia líquida de alta performance. Esta técnica utiliza uma fase móvel líquida e o suporte sólido encontra-se no interior de uma coluna.

É uma técnica realizada a alta pressão, utilizando colunas de enchimento de partículas de reduzidas dimensões e com sistemas de detecção contínua de eluato. As separações dão-se com elevada resolução e em tempos relativamente curtos, variando de alguns minutos até uma hora (Marques, 2007, p.35).

O HPLC é usado em combinação com técnicas de imunoafinidade para a determinação de micotoxinas. Para isso, procede-se à purificação com colunas de imunoafinidade, que são usadas para reter antígenos ou anticorpos, como mostra a figura 11. A utilização de IAC é incluída nos passos de extracção e lavagem.

O extracto atravessa a coluna contendo o anticorpo anti-micotoxina. A coluna é depois lavada e eluída. Depois de evaporada, se esse for o caso, e redissolvida em fase móvel, a amostra é injectada no sistema de HPLC e a detecção pode ser feita por fluorescência ou por ultravioleta.



**Figura 11.** Esquema representativo da acção da coluna sobre o extracto injectado (fonte: Analytical Venture, 2008).

O resultado da análise é um cromatograma com diversos picos, identificados pelo seu tempo de retenção, isto é, pelo tempo que o composto tarda a ser eluído.

O HPLC tem uma precisão e sensibilidade elevadas, com um limite de detecção baixo. Pode também ser automatizado (Hurst & Martin, 1998), oferecendo assim uma vantagem adicional, quando comparado com outras técnicas, como TLC ou ELISA. No entanto, as amostras têm de ser submetidas a um sistema de purificações exaustivo (Reinhard & Zimmerli, 1999; Shephard, Sydenham, Thiel, & Gelderblom 1990; Giacomelli *et al.*, 1998).

O limite de detecção para a ZEA por HPLC é de 5 µg/kg e no caso do DON, o limite de detecção é 100 µg/kg. As colunas permitem uma quantificação até 50 ppm de ZEA e 5 ppm de DON, limite acima do qual, as colunas não apresentam mais capacidade de retenção dessas micotoxinas. Se as concentrações de micotoxinas ultrapassarem os limites máximos de retenção da coluna, devem ser feitas diluições da amostra inicial, para que se proceda a uma nova quantificação.

## PARTE II - ANÁLISE MICOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DE ZEARALENONA E DEOXINIVALENOL EM ALIMENTOS COMPOSTOS PARA SUÍNOS

### 1. COLHEITA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

No presente estudo, 55 amostras de alimentos compostos para suínos, na forma granulada, foram analisadas num intervalo de 4 meses. As amostras foram colhidas em fábricas de rações situadas em várias regiões Portuguesas.

A toma de amostras para análise, obedeceu a parâmetros estabelecidos por um plano de amostragem prévio, tendo em vista a representatividade do lote. A figura 12 esquematiza as diferentes fases de amostragem. Cada fase de amostragem tem regras específicas que facilitam e orientam uma correcta amostragem, como por exemplo, a recomendação de utilização dos *kits* fornecidos pela DGV (Costa, 2005). Essas regras são baseadas nos seguintes documentos:

- Norma Portuguesa – NP3256
- Norma CEN- EN ISO 6497/2004
- Recomendação (CE) Nº 152/2009



Figura 12. Fases da amostragem de alimentos compostos para animais (fonte: Costa, 2005).

As tomas foram recolhidas aleatoriamente em diferentes unidades ou pontos do lote, e depois misturadas, de forma a obter amostras compostas. As amostras recolhidas devem manter-se microbiologicamente estabilizadas até serem analisadas. Para isso, foram acondicionadas em recipientes esterilizados e hermeticamente fechados, e foram enviadas para o laboratório em 12 horas. O transporte das amostras foi efectuado ao abrigo da luz e

da humidade. Uma vez no laboratório, quando não houve possibilidade de analisar a amostra imediatamente, esta foi conservada entre os 4 e 10°C.

O peso da amostra deve ser de aproximadamente 100 gramas mas, por exemplo, no caso de lotes em embalagens para venda a retalho já depende do peso da embalagem. Os lotes com peso igual ou superior a 50 toneladas, devem ser subdivididos em sublotes sempre que for fisicamente possível, de acordo com os dados apresentados no quadro 7. O peso do sublote pode exceder o peso indicado até um máximo de 20%. Se o lote não poder ser separado em sublotes, deve colher-se do *loteum* mínimo de 100 amostras elementares. Cada sublote deve ser objecto de uma amostragem separada, em que o peso da amostra global deve ser igual a 10kg. Para lotes com peso inferior a 50 toneladas, o plano de amostragem deve ser aplicado com a colheita de 10 a 100 amostras elementares, em função do peso do lote, resultando numa amostra global entre 1 a 10kg. Para lotes muito pequenos, inferiores ou iguais a 50 toneladas, pode colher-se um número inferior de amostras elementares, mas a amostra global que reúne todas as amostras deve pesar também, pelo menos 1kg.

| <b>Produto</b>                                   | <b>Peso do lote<br/>(ton)</b> | <b>Peso dos<br/>sublotes ou nº<br/>de sublotes</b> | <b>Nº de amostras<br/>elementares</b> | <b>Peso da<br/>amostra<br/>global (kg)</b> |
|--------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|
| Cereais e<br>produtos<br>derivados de<br>cereais | ≥ 1 500                       | 500 toneladas                                      | 100                                   | 10                                         |
|                                                  | > 300 e < 1 500               | 3 sublotes                                         | 100                                   | 10                                         |
|                                                  | ≥ 50 e ≤ 300                  | 100 toneladas                                      | 100                                   | 10                                         |
|                                                  | < 50                          | -                                                  | 3-100*                                | 1-10                                       |

\* Consoante o peso do lote

**Quadro 7. Subdivisão dos lotes em função do produto e do peso do lote (fonte: União Europeia, Regulamento (CE) Nº 401/2006).**

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Isolamento e identificação da micoflora**

Para isolar a flora micológica das amostras e proceder posteriormente à sua identificação e quantificação, seguiram-se as linhas de orientação estabelecidas pela Norma Portuguesa 3277-2 (2002) – ANEXO B. Estas linhas de orientação estão descritas seguidamente.

#### **2.1.1 Preparação da suspensão e diluição**

As amostras foram trituradas num triturador (*Retsch*) e homogeneizadas. Pesou-se 10g de amostra numa balança de precisão (*Mettler*), com o auxílio de um erlenmeyer esterilizado e adicionaram-se 90 ml de Triptona-Sal para obter uma solução de 0.1g amostra/ml. De seguida, agitou-se durante 5 minutos com um vórtex (*Maxi-Mix*), até a obtenção de uma suspensão uniforme. A suspensão-mãe obtida repousou durante 10 minutos. Por último, prepararam-se diluições decimais até se obter a diluição  $10^{-3}$  a partir da suspensão-mãe.

#### **2.1.2 Realização de Sementeiras**

De cada tubo, retirou-se 1 ml da solução final com a ajuda de uma pipeta graduada esterilizada, e inocularam-se 0.25 ml em cada uma das 4 caixas de Petri contendo Cook-Rose Bengal-Agar (*Oxoid*), suplementado com uma solução de oxitetraciclina na concentração de  $3.5\text{mg/dm}^3$ , tendo sido distribuídos uniformemente na superfície do agar com um semeador de plástico esterilizado. Esta operação repetiu-se até se obter a diluição  $10^{-3}$  devidamente semeada. As caixas semeadas foram depois colocadas a incubar em posição invertida numa estufa (*Memmert*), a  $25^{\circ}\text{C}$  graus, durante 5 dias.

#### **2.1.3 Identificação e contagem de colónias de bolores e leveduras**

Procedeu-se seguidamente à contagem de bolores e leveduras que cresceram em cada caixa de Petri. A contagem efectuou-se nas 4 placas de suspensão-mãe ou da mais alta diluição cujo número de colónias por placa fosse inferior a 150. Os géneros e espécies de bolores e leveduras encontrados foram identificados e contabilizados com a ajuda de um microscópio estereoscópico (*Wild*) e de um microscópio óptico (*Olympus*), sendo que as

ampliações utilizadas foram 40× e 400×, respectivamente. Para facilitar a identificação de características típicas dos géneros e espécies fúngicas, procedeu-se à preparação de montagens frescas de fungos repicados em Azul de Lactofenol (*Merck*).

## **2.2 Quantificação de micotoxinas**

Os procedimentos analíticos realizados, seguiram as técnicas descritas pelos standards internacionais EN 15792:2009 e EN 15791:2009, para a pesquisa de ZEA e DON, respectivamente, em alimentos para animais (ANEXOS C e D, respectivamente).

### **2.2.1 Procedimento para isolamento de Zearalenona**

Pesou-se 20g de amostra para um balão de Erlenmeyer de 250 ml, e adicionou-se 150 ml de solvente de extracção contendo água (*Lichrosolv*) e metanol (*Lichrosolv*). Agitou-se a solução durante 60 minutos com um agitador de braços para balões Erlenmeyer (*SBS*). De seguida, filtrou-se a solução com um filtro (*Whatman*). Retirou-se 30 ml de filtrado, aos quais se juntou 120 ml de solução fosfatada tamponizada (PBS) (*Sigma*), seguido de uma segunda filtração com filtro de microfibra (*Whatman*). Para activar as colunas de imunoafinidade (*VICAM*), adicionou-se 20 ml de Solução Fosfatada Tamponizada (*Sigma*) à coluna, deixando-os passar por gravidade. De seguida, transferiu-se 50 ml do filtrado para a coluna deixando-se passar também por gravidade. A coluna foi posteriormente lavada com 5 ml de solvente de lavagem, que inclui metanol e PBS. Por fim, passou-se 15 ml de água e deixou-se secar a coluna.

A eluição foi feita com 0.75 ml de metanol, aguardou-se um minuto e adicionou-se mais 0.75 ml de metanol, deixando-se de seguida secar a coluna. O eluato foi redissolvido até à marca 3 ml, agitou-se durante 30 segundos e aplicou-se 100 µl no aparelho de HPLC.

### **2.2.2 Procedimento para isolamento de Deoxinivalenol**

Pesou-se 25g de amostra para um balão de Erlenmeyer de 250 ml e adicionou-se 200 ml de água. Agitou-se a solução durante 60 minutos com um agitador de braços para balões Erlenmeyer da (*SBS*). De seguida, filtrou-se a solução com filtro (*Whatman*).

Para activar as colunas de Imunoafinidade (*VICAM*) (figura 13), adicionou-se 8 ml de água à coluna, deixando o líquido fluir por gravidade. De seguida, transferiu-se 2 ml do filtrado para a coluna e deixou-se passar também por gravidade. A coluna foi posteriormente lavada com 5 ml de água e deixou-se secar a coluna.



**Figura 13.** Coluna de imunoafinidade utilizada na extração de DON (fonte: Original, 2011).

A eluição foi feita com 0.5 ml de metanol. Esperou-se 1 minuto, e adicionou-se mais 1 ml de metanol, deixando-se de seguida secar a coluna. O eluato foi de seguida evaporado a 50°C com um evaporador rotativo (*Büchi*). Redissolveu-se com 0.5 ml de fase móvel, que inclui metanol e água, agitou-se durante 30 segundos no agitador vortex (*Maxi-Mix*) e aplicou-se 100 µl no aparelho de HPLC.

### **2.2.3 Determinação de micotoxinas por HPLC**

Para a quantificação de micotoxinas, o aparelho HPLC utilizado foi um sistema de fase reversa com enchimento *LiChrospher Agilent Technologies 1200 series* e um injetor com *loop* de 100 µl, como demonstra a figura 14. O forno está programado para manter uma temperatura de 40°C. Este aparelho tem um desgaseificador *Agilent Technologies 1200 series*, uma Coluna analítica de fase reversa (*LiChrospher*) e dois detectores, um de fluorescência e um de ultra-violeta. A bomba quaternária acoplada ao sistema é uma *Agilent Technologies 1200 series* e o sistema de tratamento de dados utilizado foi um integrador da mesma marca.



**Figura 14. Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Performance utilizado na quantificação de micotoxinas (fonte: Original, 2011).**

#### 2.2.4 Cálculo de resultados da análise micotoxicológica

O teor de DON na amostra, expresso em µg/kg ( $w_c$ ), é dado pela Equação:

$$(A) \quad w_c(DON) = \rho \times \frac{M}{m} \times \frac{V_s}{V_{ext}} \times V_{redis}$$

em que:

**M**- massa total da amostra, em gramas (1000g)

**m** – massa da amostra, em gramas (20g)

**V<sub>s</sub>** – volume de solvente de extracção, em mililitros (200 ml)

**V<sub>ext</sub>** – fracção de volume do extracto, em mililitros (1 ml)

**V<sub>redis</sub>** – volume de redissolução (fase móvel), em mililitros (0.8 ml)

**ρ** - concentração de DON, ng/ml

O teor de ZEA na amostra, expresso em µg/kg ( $w_c$ ), é dado pela Equação B:

$$(B) \quad w_c(ZEN) = \rho \times \frac{M}{m} \times \frac{V_s}{V_{ext}} \times V_{clean}$$

em que:

**M**- massa total da amostra, em gramas (1000g)

**m** – massa da amostra, em gramas (20g)

**V<sub>s</sub>** – volume de solvente de extracção, em mililitros (50 ml)

**V<sub>ext</sub>** – fracção de volume do extracto, em mililitros (1 ml)

**V<sub>clean</sub>** – fracção de volume a ser eluído, em mililitros (10 ml)

**ρ** - concentração de ZEA, ng/ml

Os resultados obtidos são sempre ajustados à taxa de recuperação, e esta é calculada de acordo com a equação C:

**(C)**

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100$$

Em que:

C1 – resultado da quantificação da amostra fortificada

C2 – resultado da quantificação da testemunha

C3 – valor do padrão

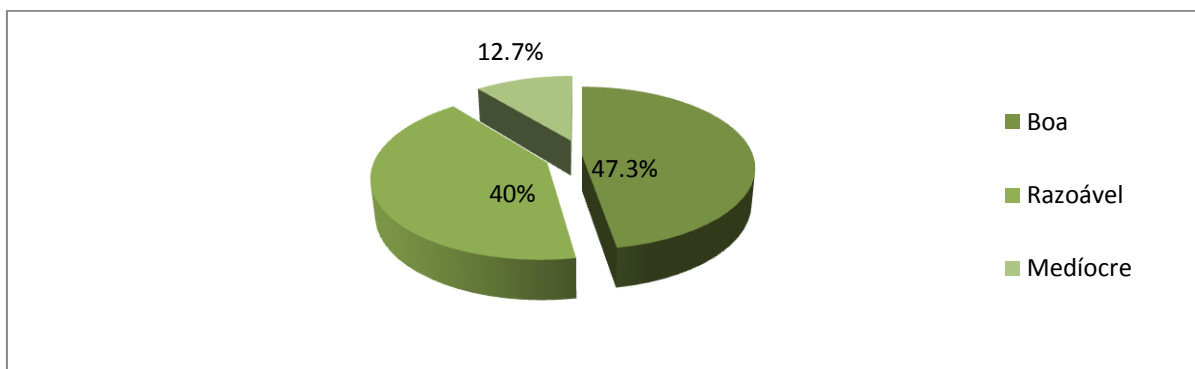
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise Micológica

A análise micológica de alimentos compostos para animais está a cair em desuso, pelo conhecimento que existe de que a flora fúngica da amostra não influencia a segurança dos alimentos, apenas a sua qualidade, além de que, neste momento, os métodos de processamento industrial eliminam a maioria dos fungos do produto final. No entanto, achei interessante incluir a análise micológica no meu trabalho, como forma de aferir sobre a qualidade das rações que distribuímos aos animais. Como foi referido anteriormente, a presença de contaminação fúngica em matérias-primas e alimentos compostos para animais, resulta na diminuição da sua ingestão, ou mesmo recusa alimentar, devido a alterações organolépticas, além da alteração do seu valor nutritivo, o que pode originar mau estar animal nos animais e perdas económicas muito significativas para os produtores.

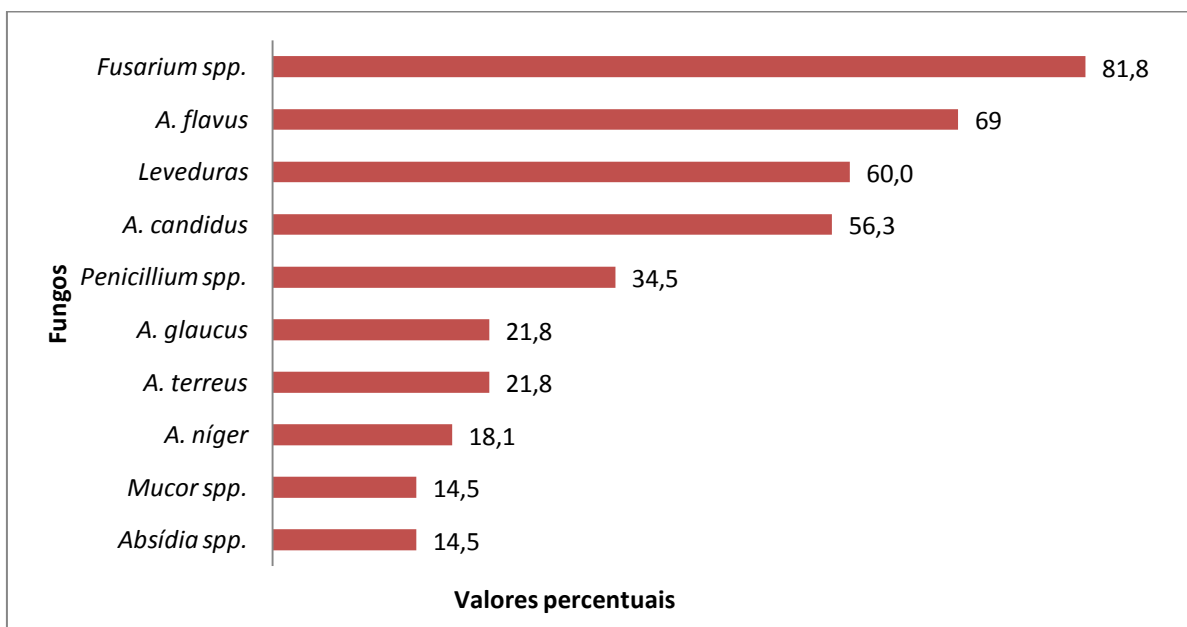
Os resultados da apreciação da qualidade micológica das 55 amostras de alimentos compostos para suínos analisadas, encontram-se esquematizadas no gráfico 1 (Resultados da contagem fúngica das amostras encontra-se no APÊNDICE A). Das 55 amostras de alimentos compostos analisadas, 52 (94.5%) encontravam-se contaminadas com fungos, com níveis de teores micológicos totais (TMT) que variaram entre  $1,9 \times 10^2$  e  $1,2 \times 10^5$  UFC/g, apresentando teores micológicos médios de  $1,7 \times 10^4$  UFC/g.

As amostras foram agrupadas de acordo com o nível de contaminação que apresentaram e classificadas com base nos níveis de referência de Laffond-Grellety (1972), sendo apresentados no gráfico 1. Das 55 amostras, 26 (47.3%) apresentaram boa qualidade, com TMT entre  $1,9 \times 10^2$  e  $3,6 \times 10^3$  UFC/g, apresentando TMM de  $3,0 \times 10^3$  UFC/g. Das 55 amostras analisadas, 22 amostras (40%) apresentaram qualidade razoável, com TMT entre  $4,4 \times 10^3$  e  $4,0 \times 10^4$  UFC/g, e TMM de  $1,9 \times 10^4$  UFC/g. Apenas 7 amostras (12.7%) foram classificadas como medíocres, contendo TMT entre  $4,5 \times 10^4$  e  $1,2 \times 10^5$  UFC/g, com TMM de  $6,6 \times 10^4$  UFC/g. Nenhuma amostra apresentou qualidade má. Estes resultados demonstram que a maioria das amostras (87.3%) apresenta uma qualidade boa ou razoável, não se revelando estes valores preocupantes quanto à qualidade das rações analisadas. Os valores baixos de contaminação fúngica encontrados podem ser justificados pelos tratamentos fungicidas/fungidiostáticos e/ou térmicos, que os alimentos compostos granulados sofrem e que geralmente reduzem significativamente a sua contaminação fúngica.



**Gráfico 1. Percentagem de amostras classificadas de acordo com a sua qualidade.**

Para uma análise micológica ser completa, não é suficiente o cálculo dos teores micológicos, pelo que se identificou também a flora fúngica presente em cada amostra. Os resultados desta análise são apresentados no gráfico 2.



**Gráfico 2. Frequência dos diferentes géneros e espécies de fungos contaminantes das amostras analisadas.**

Verificou-se que as amostras se encontravam contaminadas com espécies fúngicas muito diversificadas, perfazendo um total de 10 géneros e espécies. O género *Aspergillus* spp. esteve representado por 5 espécies.

Os teores micológicos encontrados foram relativamente baixos, o que pode indicar que estes alimentos compostos não foram sujeitos a biodegradações fúngicas muito significativas.

Os fungos mais predominantes foram o *Fusarium* spp. (81.8%), *Aspergillus flavus* (69.0%), *Leveduras* (60.0%) e *Aspergillus candidus* (56.3%). Estes fungos foram também os

que apresentaram teores micológicos médios mais elevados: *Fusarium* spp. ( $1,6 \times 10^4$  UFC/g), *Aspergillus flavus* ( $2,0 \times 10^2$  UFC/g), Leveduras ( $2,0 \times 10^2$  UFC/g) e *Aspergillus candidus* ( $6,3 \times 10^2$  UFC/g) (quadro 8).

Por outro lado, os bolores menos contabilizados foram *Mucor* spp. (14.5%), *Absidia* spp. (14.5%) e *Aspergillus niger* (18.1%). Estes bolores apresentaram teores micológicos médios de  $1,6 \times 10^1$ ;  $1,4 \times 10^1$  e  $8,9 \times 10^{-1}$  UFC/g, respectivamente, sendo estes os TMM mais baixos encontrados (quadro 8).

O género *Fusarium* spp. foi o mais frequente nas amostras analisadas (81.8%), e foi também o que revelou níveis de contaminação mais elevados. Este género é característico da flora de campo, sendo facilmente destruído pelos processos de secagem e granulação dos alimentos (Gimeno, 2010). Só consegue proliferar com actividades de água elevadas, acima de 0.88 (Gimeno, 2010), e geralmente o seu desenvolvimento cessa depois da colheita, a não ser que o armazenamento seja feito em condições de elevada humidade (Quinta, 1978). A elevada presença deste género nas amostras analisadas, pode revelar problemas a nível do armazenamento dos alimentos compostos, já que geralmente só prolifera em condições de armazenamento inadequadas.

| Géneros e espécies fúngicas | Teor médio (UFC/g)   | Teor médio ( $\log_{10}$ ) |
|-----------------------------|----------------------|----------------------------|
| <i>Fusarium</i> spp.        | $1,6 \times 10^4$    | 4.2                        |
| <i>Aspergillus flavus</i>   | $2,0 \times 10^2$    | 2.3                        |
| Leveduras                   | $2,0 \times 10^2$    | 2.3                        |
| <i>Aspergillus candidus</i> | $6,3 \times 10^2$    | 2.8                        |
| <i>Penicillium</i> spp.     | $8,7 \times 10^1$    | 1.9                        |
| <i>Aspergillus glaucus</i>  | $5,1 \times 10^1$    | 1.7                        |
| <i>Aspergillus terreus</i>  | $1,9 \times 10^1$    | 1.3                        |
| <i>Aspergillus niger</i>    | $8,9 \times 10^{-1}$ | -                          |
| <i>Mucor</i> spp.           | $1,6 \times 10^1$    | 1.2                        |
| <i>Absidia</i> spp.         | $1,4 \times 10^1$    | 1.1                        |

Quadro 8. Médias dos teores micológicos dos géneros e espécies fúngicas detectados nas amostras analisadas.

Os géneros *Aspergillus* e *Penicillium* são conhecidos como fungos de armazenamento (Torrado, 2007, p.16), pois precisam de baixas actividades de água para se desenvolverem. O crescimento do género *Aspergillus* é favorecido em climas quentes e secos, muitas vezes presentes no armazenamento, sendo por isso, contaminantes frequentes de cereais e alimentos compostos armazenados. Estes dois géneros também

estão presentes na flora de campo, pelo que as matérias-primas poderiam ter sido contaminadas no campo, e terem-se desenvolvido durante o armazenamento, quando as condições se tornaram mais favoráveis. Neste trabalho, verificou-se uma elevada frequência destes dois géneros, mas com níveis de contaminação aceitáveis no que diz respeito à sua qualidade, tendo em conta os valores de referência de Laffond-Grellety (1972). No entanto, é aconselhável rever os métodos de armazenamento, principalmente no que diz respeito à temperatura e à humidade.

A elevada presença de leveduras encontrada nas amostras (60,0%), pode dever-se a um período de armazenamento prolongado ou em condições não recomendáveis, como a falta de arejamento, temperatura e humidade elevadas (Torrado, 2007, p.31). As leveduras estiveram ausentes em 40% das amostras, e quando presentes, atingiram quantidades relativamente baixas, quando comparando com outros fungos. Isto pode dever-se ao facto de as leveduras serem mais adaptáveis a produtos líquidos, uma vez que esse tipo de ambiente proporciona uma melhor dispersão para organismos unicelulares. A presença destes seres unicelulares pode resultar em alteração das características organolépticas, o que pode originar rejeição do alimento por parte dos animais (Torrado, 2007, p. 28).

Foram encontrados dados em Portugal relativos a estudos micológicos efectuados em alimentos compostos para suínos, que já foram referidos no capítulo 2.5 deste trabalho, mas que serão agora discutidos comparativamente aos resultados encontrados.

Um estudo efectuado por Martins em 1987, revelou valores de contaminação bastante elevados quando comparados com os do presente estudo (Martins, 1987, p.145-152). Nesse estudo, foi verificada uma variabilidade sazonal, registando-se sistematicamente os valores mais elevados de carga fúngica nos meses referentes à Primavera e Verão.

Num estudo efectuado em Portugal, verificou-se a contaminação de rações para suínos em 18.9% das 106 amostras analisadas, com teores médios de bolores de  $4.9 \log_{10}$  UFC/g, tendo sido os géneros predominantes o *Aspergillus* spp. (70%), *Mucor* spp. (58%), *Penicillium* spp. (54%) e *Fusarium* spp. (24%) (Martins & Martins, 2001). Os resultados demonstram menos amostras contaminadas e com médias de fungos mais baixas do que as apresentadas pelo presente estudo. No entanto, as médias de fungos apresentadas pelo presente estudo foram mais reduzidas para todos os fungos estudados. Estes resultados podem ser explicados pelo maior intervalo de análise das amostras, já que foram analisadas no intervalo de um ano (2001), sendo que foram fabricadas com matérias-primas colhidas em diferentes alturas do ano, o que provoca variações nos níveis de proliferação dos fungos.

Um estudo efectuado por Martins no intervalo de 1999 e 2002, no qual 74 amostras de alimentos compostos para suínos foram analisadas, revelaram que os fungos mais comuns foram leveduras, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *A. flavus*, com médias de  $3.2\log_{10}$ ,  $2.9\log_{10}$ ,  $2.6\log_{10}$  e  $2.2\log_{10}$  UFC/g, respectivamente (Martins, 2003). As médias foram mais baixas no estudo presente, exceptuando a espécie *A. flavus* que apresentou igual valor médio, e o género *Aspergillus* que foi dividido de acordo com as suas espécies, não tendo sido analisado como um todo no presente estudo.

Num estudo efectuado em 2007, foram analisadas 75 amostras de alimentos compostos para suínos, das quais 73 (97.3%) se encontravam contaminadas por fungos. O teor micológico médio encontrado foi de  $3.7\log_{10}$  UFC/g. Os bolores mais frequentes foram os géneros *Aspergillus* (84.9%) (TMM =  $6.6\log_{10}$  UFC/g), *Penicillium* (74%) (TMM =  $3\log_{10}$  UFC/g), *Clamidosporum*, *Mucor* (71.2%) (TMM =  $2.3\log_{10}$  UFC/g) e *Fusarium* (61.6%) (TMM =  $3.2\log_{10}$  UFC/g) (Torrado, 2007, p.31). Num outro estudo efectuado em 2007, 75 amostras do mesmo substrato foram analisadas, e registaram-se 97.3% de amostras contaminadas com fungos. Os níveis de fungos encontrados por Almeida *et al.* (2007) no mesmo estudo, demonstraram uma média de fungos de  $2.8\log_{10}$  UFC/g. *Fusarium* spp., *Aspergillus flavus* e *Penicillium* sps. foram os géneros mais frequentes. Torrado (2007), encontrou médias mais elevadas de fungos, com excepção para o género *Fusarium*. (Torrado, 2007, p.31). Já Almeida *et al.* (2007), encontrou valores mínimos e máximos de fungos mais baixos, quando comparados com o presente estudo.

Almeida, Martins, Guerra, & Bernardo, 2008, analisaram 45 amostras de grãos de aveia, e encontraram 100% de amostras contaminadas, tendo sido os géneros mais comuns o *Aspergillus* (100%), *Penicillium* (48.8%), *Fusarium* (44.8%). Dentro do género *Aspergillus* spp., *A. glaucus* (84.4%) e *A. flavus* (71.1%) foram os mais encontrados. Apenas 31% das amostras continham leveduras. Este estudo encontrou um maior número de amostras contaminadas, com níveis mínimos e máximos mais elevados em comparação com os do presente estudo.

Os valores encontrados de contaminação fúngica ao longo dos anos foi muito flutuante, mas relativamente ao estudo de Martins (1987), pode dizer-se que houve uma evolução muito positiva nas duas últimas décadas, com um decréscimo muito acentuado nos níveis de contaminação fúngica. O estudo de Almeida *et al.* (2008), revela também níveis mais elevados de contaminação, quando comparado com o estudo presente. Esta diminuição das contaminações pode ser explicada através das melhorias aplicadas a nível tecnológico nas etapas de colheita e armazenamento das matérias-primas e alimentos compostos para animais, incluindo rapidez na secagem, correcto uso de

fungicidas/fungistáticos e correcto armazenamento, consequências da aplicação de sistemas HACCP adaptados a este tipo de produção.

Existem actualmente técnicas que permitem uma identificação muito específica das espécies fúngicas contaminantes de alimentos, das quais vale a pena referir o PCR (*Polimerase chain reaction*), que permite a identificação das espécies a partir de bases de dados contendo a informação genética de cada espécie.

### 3.2 Análise Micotoxicológica

As 55 amostras de alimentos compostos para suínos, foram também sujeitas à quantificação de ZEA e DON (APÊNDICE C).

Das 55 amostras analisadas, 18 amostras estavam contaminadas com ZEA (32.7%) e 13 amostras com DON (23.6%), variando os valores entre 6,1 e  $5,4 \times 10^1$  µg/Kg de ZEA e  $1,0 \times 10^2$  a  $9,0 \times 10^2$  µg/Kg de DON, como se pode verificar nos dados do quadro 9. A média encontrada de contaminação com ZEA foi de 6.9 µg/Kg e com DON foi de  $1.3 \times 10^2$  µg/Kg (Quadro 9).

Foi observada co-ocorrência em apenas 3 amostras (5,5%). Todos os valores encontrados estavam abaixo dos valores de orientação recomendados pela União Europeia, apesar de 3 amostras apresentarem valores de contaminação com DON de  $9,0 \times 10^2$  µg/Kg (5,5%), sendo este o valor máximo admissível pela União Europeia.

|                       | ZEA                       | DON                                   |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Nº amostras positivas | 18                        | 13                                    |
| % amostras positivas  | 32.7                      | 23.6                                  |
| Nº amostras negativas | 37                        | 42                                    |
| % amostras negativas  | 67.3                      | 76.3                                  |
| Mínimo (µg/Kg)        | 6.1                       | $1.0 \times 10^2$                     |
| Máximo (µg/Kg)        | $5.4 \times 10^1$         | $9.0 \times 10^2$                     |
| Média (µg/Kg) ± DP    | $6.9 \pm 1.3 \times 10^1$ | $1.3 \times 10^2 \pm 2.8 \times 10^2$ |

DP - Desvio-Padrão

**Quadro 9.** Frequência e percentagens de amostras positivas e negativas para a presença de ZEA e DON, máximos, mínimos e médias encontradas.

A medida de dispersão utilizada (neste caso o desvio-padrão) foi muito elevada, factor que torna a média apresentada menos representativa. Para efectuar uma melhor

localização dos dados, as amostras foram agrupadas de acordo com níveis de contaminação, de forma a facilitar a análise dos resultados. Os quadros 10 e 11 mostram o resultado desse agrupamento.

|                    | [5;20]*           | ]20;50]*          | ]50;60]* |
|--------------------|-------------------|-------------------|----------|
| <b>Nº amostras</b> | 13                | 4                 | 1        |
| <b>% amostras</b>  | 72.2              | 22.2              | 5.6      |
| <b>Média*</b>      | $1.4 \times 10^1$ | $3.8 \times 10^1$ | -        |

(\*) µg/kg

**Quadro 10. Frequência e percentagem de amostras positivas para ZEA, agrupadas de acordo com o teor micotoxicológico.**

|                    | [100;300]*        | ]300;600]*        | ]600; 900]*       |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Nº amostras</b> | 4                 | 3                 | 6                 |
| <b>% amostras</b>  | 30.7              | 23.1              | 46.2              |
| <b>Média*</b>      | $1.9 \times 10^2$ | $5.7 \times 10^2$ | $8.0 \times 10^2$ |

(\*) µg/kg

**Quadro 11. Frequência e percentagem de amostras positivas para DON, agrupadas de acordo com o teor micotoxicológico.**

Os níveis de contaminação com ZEA foram bastante baixos, já que não ultrapassaram valores de  $5,4 \times 10^1$  µg/kg, e 13 das amostras positivas para ZEA (72.2% das amostras positivas) não ultrapassaram os  $1.9 \times 10^1$  µg/kg (quadro 10).

Como se pode observar nos dados do quadro 11, 6 amostras de alimentos compostos para suínos, apresentaram níveis de contaminação com DON variando de  $6.1 \times 10^2$  a  $9.0 \times 10^2$  µg/kg. Sendo o valor de orientação recomendado pela União Europeia para esta micotoxina de 900 µg/kg, estas 6 amostras contêm valores relativamente elevados, não ultrapassando no entanto o limite referido.

Os valores de orientação recomendados pela UE visam estabelecer um intervalo de segurança, no qual os efeitos das micotoxinas não são detectáveis. O problema desta abordagem, consiste no facto de que as micotoxicoses crónicas podem provocar sinais clínicos subtis, mas igualmente negativos para as explorações, no que diz respeito às perdas económicas e ao bem-estar animal. Por outro lado, as interações entre diferentes micotoxinas, mesmo que em níveis abaixo dos recomendados, não estão ainda totalmente esclarecidas, pelo que estudos nesta área devem ser desenvolvidos. Vários estudos comprovaram já a ocorrência de efeitos aditivos ou sinérgicos entre micotoxinas, sendo que um deles relata efeitos negativos na saúde de suínos alimentados com níveis supostamente aceitáveis (Chen *et al.*, 2008). Outro ponto importante referido na Recomendação (CE) Nº

576/2006, indica que os valores definidos pela UE foram calculados com base nas espécies menos sensíveis, categoria na qual os suínos não se enquadram, já que são espécies muito sensíveis, pelo que valores *border-line* como os que foram encontrados para a contaminação com DON, podem representar problemas na saúde destes animais.

Foi efectuada uma comparação entre a presença de *Fusarium* spp. numa determinada amostra, e a presença de contaminação por micotoxinas (APÊNDICE B).

Das 55 amostras analisadas, 10 não continham teores de *Fusarium* spp., mas continham ZEA (40.0%), DON (30.0%) ou co-ocorrência das duas (10.0%). Os valores encontrados de micotoxinas em amostras negativas para a presença de *Fusarium* spp. variaram entre 8,6 a  $4,7 \times 10^1$  para a ZEA e entre  $6,0 \times 10^2$  e  $9,0 \times 10^2$  para DON. Os valores encontrados de contaminação com ZEA são relativamente baixos, mas os valores de contaminação com DON foram bastante elevados. Estes resultados vão de acordo com o conhecimento de que a ausência de fungos em alimentos compostos para animais, não implica a ausência de micotoxinas, já que estas podem permanecer activas em substratos onde os fungos tenham já sido inactivados.

Por outro lado, foram encontradas 45 amostras contaminadas com *Fusarium* spp. (81.8%) das quais, 23 (51.1%) não apresentavam presença de ZEA ou DON. A presença de um determinado fungo em alimentos compostos, não implica que ele tenha produzido micotoxinas, já que pode não ter essa capacidade, ou podem não ter sido oferecidas as condições ecológicas necessárias para que estas fossem produzidas. Foi isso, provavelmente, que se verificou com estes resultados, já que 23 das amostras contaminadas com *Fusarium* spp., não continham ZEA ou DON.

Torna-se assim óbvia a importância da determinação de micotoxinas em alimentos compostos, já que uma simples análise micológica não é suficiente para excluir ou confirmar a presença de micotoxinas nesses alimentos.

Vários estudos foram feitos em anos anteriores relativamente à presença de micotoxinas em alimentos compostos para suínos.

Num artigo de revisão de 2008, relativo à incidência de ZEA e DON em alimentos compostos para suínos no intervalo de 2000 a 2007, encontraram-se 3.0% de amostras contaminadas com DON (9 em 291 amostras analisadas) ( $1,0 \times 10^2$ - $1,6 \times 10^3$  µg/kg) e 5 % de amostras contaminadas com ZEA ( $1,0 \times 10^2$  -  $3,5 \times 10^2$  µg/kg) (Martins *et al.*, 2008). Esta análise foi realizada por TLC. Este método tem um limite de detecção inferior ao do HPLC, pelo que amostras que continham níveis inferiores de micotoxinas não foram contabilizadas, o que pode ocasionar resultados menos sensíveis, quando comparando com o método utilizado no presente estudo.

No nosso estudo verificou-se um valor superior de amostras contaminadas com uma das micotoxinas (apesar de os níveis de micotoxinas serem inferiores), o que demonstra que, apesar das medidas de monitorização e prevenção contra a produção de micotoxinas em alimentos compostos e matérias-primas, o número de amostras contaminadas aumentou neste estudo, em relação a anos anteriores.

Um estudo efectuado em 2008, analisou 45 amostras de grãos de aveia e encontrou 2 amostras contaminadas com DON (4.5%), sendo que o valor máximo encontrado desta micotoxina foi de  $7.1 \times 10^2 \mu\text{g/kg}$  (Almeida *et al.* 2008).

Um outro estudo efectuado em 2008, analisou a co-ocorrência de ZEA e DON em 307 amostras de matérias-primas, e encontrou 15% de co-ocorrência. As médias de ZEA e DON foram de  $1.9 \log_{10}$  e  $2.4 \log_{10} \mu\text{g/kg}$ , respectivamente. Apenas 1 amostra continha níveis acima dos recomendados pela UE (Marques, Martins, Costa, & Bernardo, 2008).

O nosso estudo revela um aumento na taxa de ocorrência de DON (23.6%), e um nível máximo de DON superior ( $9.0 \times 10^2 \mu\text{g/kg}$ ), em relação ao estudo efectuado por Almeida *et al.* (2008). Por outro lado, em comparação com os resultados obtidos por Marques *et al.* em 2008, a taxa de co-ocorrência diminuiu (5.5%) em relação a esse estudo, mas os níveis de micotoxinas encontrados nesse estudo foram superiores aos encontrados no nosso estudo. É importante referir que os valores encontrados nos diferentes estudos se podem dever a problemas relativos a amostragens incorrectas, assim como a discrepâncias causadas por colheitas em diferentes alturas do ano. Os fungos e micotoxinas distribuem-se de forma heterogénea nos alimentos compostos, tendendo a formar bolsas concentradas de fungos e/ou micotoxinas, pelo que é importante assegurar que a amostra seja representativa (Krska, Welzig, Berthiller, Molinelli, & Mizaikoff, 2005), homogénea e íntegra. Uma amostragem incorrecta constitui um problema comum na quantificação de micotoxinas, introduzindo frequentemente erros e variabilidade nos resultados.

Por outro lado, o aumento dos níveis de micotoxinas em 2010, em comparação com os valores encontrados em anos anteriores, mostra que apesar de existirem neste momento melhores técnicas de prevenção, monitorização e detecção de micotoxinas, há ainda trabalho a ser feito neste campo. Estudos recentes mostram que o aquecimento global pode ter um papel preponderante no aumento de contaminações por micotoxinas, uma vez que elevadas temperaturas e humidades oferecem aos fungos as condições ideais para a produção destas. Caso o aquecimento global continue a resultar em verões muito chuvosos, serão necessárias medidas bastante rígidas de vigilância e disciplina de adoção de medidas protectoras para detectar e controlar o crescimento de fungos (Gadd, 2008).

Este estudo apresentou como limitante, o facto de terem sido analisadas apenas duas micotoxinas, sendo que a co-ocorrência com outras micotoxinas não estudadas neste

trabalho seria interessante para completar o estudo presente. As micotoxinas apresentam capacidade tóxica com valores muito reduzidos, pelo que os métodos escolhidos para a sua detecção têm de ser muito sensíveis e fiáveis. Por outro lado, têm estruturas químicas muito variáveis, pelo que o uso de um único protocolo para todas as micotoxinas não é possível. O método utilizado neste trabalho é muito sensível, e permite a multi-análise de micotoxinas, não sendo no entanto prático, já que nem sempre é necessária a análise de mais de duas ou três micotoxinas, de acordo com a matriz em questão. Existem neste momento, outras técnicas que permitem a detecção simultânea de várias micotoxinas. Num estudo de revisão efectuado por Turner *et al.* (2009), concluiu-se que não existe neste momento nenhuma técnica que suplante todas as outras, mas existem métodos que permitem a detecção simultânea de várias micotoxinas, como por exemplo o método de ELISA e o método LC-MS/MS, sendo que estes métodos apresentam, no entanto, outras desvantagens que já foram referidas.

## CONCLUSÃO

Os fungos são responsáveis pela deterioração de matérias-primas e de produtos transformados, destinados à alimentação de animais e humanos. Além de alterarem as características organolépticas desses alimentos podendo mesmo alterar o seu valor nutritivo, provocam recusa alimentar ou diminuição da ingestão de alimentos por parte dos animais, podendo ainda produzir, se tiverem condições atmosféricas apropriadas, metabolitos secundários tóxicos.

A recusa alimentar devido a alterações de características organolépticas, provoca perda de peso nos animais, diminuindo assim os seus índices produtivos. A contaminação dos alimentos com metabolitos secundários pode levar a micotoxicoses agudas, mas também a doença subclínica, que pode passar despercebida aos produtores, ou ser confundida com outras patologias pelos veterinários, o que leva a perdas económicas muito significativas nas explorações de suínos.

As perdas económicas associadas à contaminação alimentar por micotoxinas, relacionam-se não só com a perda de lucro pelos produtores de animais, mas também com os custos associados à destruição das rações contaminadas.

Os resultados encontrados neste trabalho, dão conta de uma grande percentagem de amostras de qualidade boa e razoável, mas também foi documentada uma pequena percentagem de amostras de qualidade medíocre. Este facto demonstra que as medidas de prevenção contra as contaminações alimentares com fungos não foram totalmente eficazes, mas apresentam um nível bastante satisfatório para a maioria das amostras analisadas. Quanto à presença de micotoxinas, foram detectados apenas valores abaixo dos limites recomendados pela União Europeia, mas algumas amostras continham valores de DON *border-line*. Estes resultados demonstram que as medidas de monitorização apresentam uma eficácia razoável/boa, mas também que devem ser melhoradas e a quantificação de micotoxinas deve ser continuada, pois só assim se pode reduzir ao máximo a probabilidade de contaminação dos animais. Na prática, é importante a adopção de técnicas que visam a manutenção da qualidade do produto acabado, tais como: a aquisição de produtos de elevada qualidade, instalação de sistemas de controlo de arejamento, humidade e temperatura, assim como a adopção de medidas de fumigação e desratização, a fim de evitar o desenvolvimento de insectos, ratos e ácaros.

Concluiu-se que a análise micológica é meramente orientativa relativamente às precauções adicionais que têm de se acrescentar às diversas fases de produção dos

alimentos. Para se ter uma ideia real da segurança alimentar dos produtos fabricados, é essencial a detecção e quantificação de micotoxinas nos produtos finais para consumo.

Os fungos encontrados com maior frequência nas amostras de alimentos compostos para suínos analisadas foram o *Fusarium* spp., o *Aspergillus flavus* e as leveduras.

Os fungos são ubiqüitários, e como tal, a ideia de que podemos eliminá-los totalmente é pouco realista. Todavia, para reduzir ao máximo os efeitos nefastos provocados por estes organismos, é fundamental adoptar medidas preventivas e de monitorização das condições de colheita, armazenagem, transporte e processamento das matérias-primas e alimentos compostos.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbas, H., Shier, W.T., Seo, J., Lee, Y., & Musser, S.M. (1998). Phytotoxicity and cytotoxicity of the fumonosin C and P series of mycotoxins from *Fusarium* spp. fungi. *Toxicon*, 36, 2033-2037.
- Ainsworth, G.C., & Austwick, P.K.C. (1973). *Fungal Diseases of Animals*. (2<sup>a</sup> ed.) Slough, Common wealth Agricultural Bureau, Bucks, England.
- Alm, H., Greising, T., Brussow, K.P., Torner, H., & Tiemann, U.(2002). The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on in vitro maturation of pig oocytes and in vitro culture of pizygotes. *Toxicology In Vitro*, 16, 643–648.
- Almeida, I., Marques, M., Torrado, E., & Martins, M. (2007). *Occurence of mycobiota in swine feed*. Comunicação apresentada no Congresso BiomicroWorld2007, Sevilha, Espanha.
- Almeida, I., Martins, H.M., Guerra, M., & Bernardo, F. (2008). *Molds spoilage of oats grains and mycotoxins evaluation*, Comunicação apresentada no 4º congresso de Ciências Veterinárias, Lisboa., Portugal.
- Almeida, I., Martins, H.M., Santos, S., Costa, J.M., & Bernardo, F. (2011, Abril 19). Co-occurrence of mycotoxins in swine feed produced in Portugal, *Mycotoxin Research*, 1-5.
- Analytical Venture (2008). *Size Exclusion HPLC*, In <http://www.analyticalventura.com/>. Acedido em 12 de Novembro de 2010 em <http://www.analyticalventura.com/se-hplc.shtml>.
- Ansari, A. A., Shrivastava, A. K. (1990). Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in sorghum and ragi from North Bihar, India, *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 7, 815-820.
- Aoyama, K., Ishikuro, E., Nichiwaki, M., & Ichinoe, M. (2009). Zearalenone Contamination and the Causative Fungi in Sorghum, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 50 (2), 47-51.

- Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos compostos para Animais [IACA]. (2009). Uma indústria de confiança. In <http://www.iaca.pt/index.jsp?page=industry&lang=pt>. Acedido a 17 de Janeiro, 2011 em <http://www.iaca.pt/>.
- Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais [IACA]. (2011b). *Relatório de actividades de 2010*. Obtido em 19 de Junho de 2011 de IACA: <http://www.iaca.pt/index.jsp?page=report2010&lang=pt>.
- Bennett, J.W., & Klich, M. (2003, Julho). Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, 497–516.
- Bergsjø, B., Langseth, W., Nafstad, I., Jansen, J.H., & Larsen, H.J.S. (1993). The effects of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on the clinical condition, blood parameters, performance and carcass composition of growing pigs. *Veterinary Research Communications*, 17(4), 283-294.
- Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., & Richard, J. (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients, *Animal feed science and technology*, 137 (3-4), 265-282.
- Bruns, T. (2006). Evolutionary biology: a kingdom revised. *Nature*, 443 (7113), 758–761.
- Bush, K. (2010, Dezembro). The coming of age of antibiotics: discovery and therapeutic value, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1213, 1-4.
- Butler, W.H. (1975). Mycotoxins. In: J.E. Smith & D.R. Berry, (Eds.), *The filamentous fungi*, 1, London, United Kingdom, 320–329.
- Caloni, F., & Cortinovis, C. (2010, Novembro). Effects of fusariotoxins in the equine species, *Veterinary Journal*, 186(2), 157-61.
- Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A.J., Peris-Vicente, J., & Sanchis, V. (2010). Occurrence of aflatoxin M1 and exposure assessment in Catalonia (Spain), *Revista Iberoamericana de Micologia*, 27(3), 130–135.
- Cartage. (2006). Science In: <http://www.cartage.org.lb/en/themes/mainpage.htm>. Acedido em 12 de Dezembro de 2010 em <http://www.cartage.org.lb/en/themes/mainpage.htm>.

- Chaytor, C., See, M.T., Hansen, J.A., Souza, A.L.P., Middleton, T.F., & Kim, S.W. (2011, Janeiro). Effects of chronic exposure of diets with reduced concentrations of aflatoxin and deoxynivalenol on growth and immune status of pigs, *Journal of animal science*, 89 (1), 124-135.
- Chen, F., Ma, Y., Xue, C., Ma, J., Xie, Q., Wang, G., Bi, Y., & Cao, Y. (2008, Março). The combination of deoxynivalenol and zearalenone at permitted feed concentrations causes serious physiological effects in young pigs, *Journal of Veterinary Sciences*, 9(1), 39–44.
- Ciegler, A., Burmeister, H.R., Vesonder, R.F., & Hesseltine, C.W. (1981). Mycotoxins: occurrence in the environment, 1–50. In: R. C. Shank (Ed.), *Mycotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks*, CRC Press Inc, 1.
- Comunidade Europeia, Regulamento (CE) Nº 466/2001 da Comissão de 8 de Março, Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L 77/6 - 77/7.
- Coppock, R.W., Christian, R.G. (2007). Aflatoxins. In: R.C. Gupta (Ed.) *Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles*. Academic Press, 939-950.
- Costa, J.M., (2005). *Formação: Colheitas de amostras*, Inspeção Geral das Actividades Económicas (IGAE).
- Council for Agricultural Science and Technology [CAST]. (1979). *Aflatoxin and Other Mycotoxins: An Agricultural Perspective*. Report 80. Ames.
- Council for Agricultural Science and Technology [CAST]. (2003). *Mycotoxins: Risk in Plant, Animal and Human Systems*. Council for Agricultural Science and Technology Ames: Task Force Report, 139, 199.
- Dänicke, S., Valenta, H., Klobasa, F., Doll, S., Ganter, M., & Flachowsky, G. (2004). Effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated wheat in diets for fattening pigs on growth performance, nutrient digestibility, deoxynivalenol balance and clinical serum characteristics. *Archives of animal nutrition*, 58, 1–17.
- Dänicke, S., Brüssow, K.P., Goyarts, T., Valenta, H., Ueberschär, K.H., & Tiemann, U. (2007, Setembro). On the transfer of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from the sow to the full-term piglet during the last third of gestation. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1565-1574.

- Diaz-Llano, G., & Smith, T.K. (2006). Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins with and without a polymeric glucomannan adsorbent on reproductive performance and serum chemistry of pregnant gilts, *Journal of Animal Science*, 84, 2361–2366.
- Diaz-Llano, G., & Smith, T. K. (2007). The effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins with and without a polymeric glucomannan adsorbent on lactation, serum chemistry and reproductive performance after weaning of first-parity lactating sows. *Journal of Animal Science*, 85, 1412–1423.
- Diekman, D.A., Green, M.L. (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science*, 70, 1615-1627.
- Diesing, A.K., Nossol, C., Dänicke, S., Walk, N., Post, A., Kahlert, S., et al. (2011, Fevereiro 25). Vulnerability of Polarised Intestinal Porcine Epithelial Cells to Mycotoxin Deoxynivalenol Depends on the Route of Application. *PLoS ONE*, 6(2), 17472.
- Dilkin, P., Mallmann, C.A., & Santurio, J.M. (2000). Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho, *Ciência Rural*, 30(1), 137-141.
- Dixon, B. (1998). Power Unseen, How Microbes Rule the World, *Oxford University Press*, 124, 165-68.
- Döll, S., & Dänicke, S. (2011, Maio 13). The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding, *Preventive Veterinary Medicine*, doi:10.1016/j.prevetmed.2011.04.008.
- Driehuis, F., Spanjer, M.C., Scholten, J.M., & Te Giffel, M.C. (2008). Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food additives and contaminants: Part B*, 1(1), 41-50.
- Dupuy, J., Le Bars, P., Boudra, H., & Le Bars, J. (1993, Setembro). Thermostability of Fumonisin B<sub>1</sub>, a Mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in Corn, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2864-2867.
- Egmond, H.P.V. (1989). Mycotoxins in Dairy Products, *Elsevier Applied Science*, p.113, London, New York.
- Etienne, M., & Dourmad, J. Y. (1994). Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: A review. *Livestock Production Science* 40(2), 99-113.

- European Mycotoxin Awareness Network (2011). Zearalenone In: <http://www.mycotoxins.org/>. Acedido em 23 de Janeiro de 2011 em <http://www.mycotoxins.org/>.
- European Standard- FprEn15792. (2009). Animal feeding stuffs- Determination of Zearalenone in animal feed- high performance liquid chromatography method with fluorescence detection. And immunoaffinity column clean –up.
- European Standard-FprEn15791. (2009). Foodstuffs-Determination of deoxynivalenol in animal feed- HPLC method with immunoaffinity column clean –up.
- Figuerola, S., Centeno, S., Calvo, M.A., Rengel, A., & Adelantado, C. (2009, Abril 1). Mycobiota and concentration of ochratoxin A in concentrated poultry feed from Venezuela. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(7), 589-94.
- Filho, M.J. (2005). Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: *Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz*, 495.e
- Gadd, J. (2008). International Pig Management Consultancy - (Part I) In: [www.knowMycotoxins.com](http://www.knowMycotoxins.com). Acedido em 12 de Maio de 2011 em [www.knowMycotoxins.com](http://www.knowMycotoxins.com).
- Gaumy, J.L., Bailly, J.D., Burgat, V., & Guerre, P.(2001). Zéaralénone: propriétés et toxicité expérimentale. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 152, 219-234.
- Georgianna, D.R., & Payne, G.A. (2009, Fevereiro). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, 46(2), 113-25.
- Giacomelli, L., Boggetti, H., Agnelli, H., Anunziata, J., Silber, J.J., & Cattana, R. (1998, Agosto 31). Relevant physicochemical factors in chromatographic separation of *Alternaria alternata* mycotoxins, *Analytica Chimica Acta*, 370(1), 79.
- Gimeno, A. (2010, Setembro). O impacto negativo de algumas micotoxinas nas vacas leiteiras, *Revista de Veterinária Albeitar de Portugal*, 4 (5), 42-52.
- Golinski, P., Chelkowski, J., Grabarkiewicz-Szczesna, J., & Szebiotko, K. (1983). Estimation of mycotoxic porcine nephropathy and ochratoxin A residues in porcine kidneys, *Medycyna Wetetynaryjna*, 39, 407–408.

- Goryacheva, I.Y., De Saeger, S., Eremin, S.A., & Van Peteghem, C. (2007). Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: evolution from single to multiple analyte screening: A review. *Food Additive and Contaminants*, 24(10), 1169-1183.
- Gouveia, M.F. (2004). Controlo e Qualidade Micológica em Matérias-Primas e Alimentos Compostos para Animais. Relatório de Estágio apresentado ao Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, para obtenção do grau de Licenciatura em Biologia, Aveiro.
- Gouveia, M.F., Guerra, M.M., Martins, H.M., Bernardo, F.M. (2005). *Mycoflora characterisation of swine feed*. Comunicação apresentada no Congresso de Ciências Veterinárias 2005, Santarém, Portugal.
- Goyarts, T., Grove, N., & Danike, S. (2006). Effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol from naturally contaminated wheat given subchronically or as one single dose on the *in vivo* protein synthesis of peripheral blood lymphocytes and plasma proteins in the pig, *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1953–1965.
- Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A.M. (1999). Developments in Fungal Taxonomy, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3), 454-500.
- Gugnani, H.C. (2003). Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Frontiers in bioscience*, 8, 346-357.
- Harris, S. (2008). Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems, *Mycologia*, 100(6), 823–832.
- Harrison, L.R., Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.E., & Cole, J.R. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine by fumonisin B1 a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2, 217-221.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N., (1995). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* (8<sup>th</sup> Ed.) CAB International, Wallingford, 616, United Kingdom.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., *et al.* (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi, *Mycological Research*, 111 (5), 509–547.

- Hsu, I.C., Smalley, C.B., Strong, F.M., & Ribelin, W.E. (1972). Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. *Applied Microbiology*, 24, 684-690.
- Hughes, D.M., Gahl, M.J., Graham, C.H., & Grieb, S.L. (1999). Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. *Journal of animal Science*, 77, 693–700.
- Hurst, W.J., & Martin Jr, R.A. (1998). High-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin a in artificially contaminated cocoa beans using automated sample clean-up. *Journal of Chromatography A*, 810, 89.
- International Agency for Research on Cancer. (1984). The Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. *IARC monograph Supplement 4*, Lyon.
- Jakić-Dimić, D., Nešić, K., & Petrović, M. (2009). Mycotoxins in feed for pigs and poultry, *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25, 1149–1154.
- Jakimiuk, E., Gajecka, M., Jana, B., Brzuzan, P., Zielonka, Ł., Skorska-Wyszyńska, E., *et al.* (2009). Factors determining sensitivity of prepubertal gilts to hormonal influence of zearalenone. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 12(1), 149-58.
- Jiang, S.Z., Yang, Z.B., Yang, W.R., Gao, J., Liu, F.X., Broomhead, J., *et al.* (2011, April 29). Effects of purified zearalenone on growth performance, organ size, serum metabolites, and oxidative stress in post-weaning gilts, *Journal of Animal Science*, 3658.
- Jiao, Y., Blaas, W., Ruhl, C., & Weber, R.J. (1992). Identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 595, 364-367.
- Jørgensen, K. (2005). Occurrence of Ochratoxin A in commodities and processed food – A review of EU occurrence data, *Food Additive and Contaminants*, 1, 26-30.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., & Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*, *Acta Biochimica Polonica*, 56(2), 211–224.

- Kawashima, L. M. (2004). Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil. Tese apresentada ao Departamento de Ciências dos alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Doutorado em Ciências dos alimentos, orientada por Lucia Maria Valente Soares, Brasil.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the fungi*, 10<sup>th</sup> edition, CABI, Wallingford.
- Know Mycotoxins. (2008). Formação de micotoxina durante o armazenamento In <http://www.knowmycotoxins.com/pt/index.htm>. Acedido a 17 de Junho de 2011 in <http://www.knowmycotoxins.com/pt/npoultry5.htm>.
- Kobayashi, G.S., (1980). *Fungi in Microbiology, including imunology and molecular genetics (Davis.B.)* (3<sup>rd</sup>. ed, vol. 45) Ed. Harper and Row, Publishers, Inc. Hagerstown (Maryland), 817-850.
- Krabble, E.L., Penz, J.R., Lazzari, F.A., & Reginatto, M.F. (1994). Efeito da humidade e do ácido propiónico sobre as características bromatológicas e microbiológicas de grãos de milho, In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, Santos, (p. 27), Anais, Campinas.
- Krska, R., Welzig, E., Berthiller, F., Molinelli, A., & Mizaikoff, B. (2005). Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance, *Food Additives and Contaminants*, 22(4), 345-353.
- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Baylei, R.H., Buckley, A.S., & Rottinghaus, G.E. (1998). Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate (TBind<sup>TM</sup>) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science*, 77, 1502-1509.
- Kuhn, D.M., & Ghannoum, M. A. (2003, Janeiro). Indoor Mold, Toxigenic Fungi, and *Stachybotrys chartarum*: Infectious Disease Perspective, *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 144–172.
- Lacaz, C.D., Minami, S.P., Purchio, A. (1970). *O grande mundo dos fungos*. Polígno, S. Paulo, 1-255.
- Laffond-Grellety, J. (1972). *L' analyse mycologique des aliments du Betail – Les Industries de l' alimentation animal*, 1, 9-22.

- Lallès, J.P., Lessard, M., Oswald, I.P., & David, J.C. (2010). Consumption of fumonisin B1 for 9 days induces stress proteins along the gastrointestinal tract of pigs. *Toxicon*, 55(2-3), 244-9.
- Latgé, J.P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology*, 9, 382–389.
- Li, F.Q., Yoshizawa, T., Kawamura, O., Luo, X.Y., & Li, Y.W. (2001). Aflatoxins and fumonisins in corn from the highincidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 4122-426.
- Luca, A.J. (2007). Harmful fungi in both Agriculture and Medicine, *Revista Iberoamericana de Micologia*, 24, 3-13.
- Malekinejad, H., Maas-Bakker, R., & Fink-Gremmels, J. (2005). Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. *Veterinary Research*, 36, 799-810.
- Malekinejad, H., Maas-Bakker, R., & Fink-Gremmels, J. (2006). Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Veterinary Journal*, 172, 96-102.
- Malekinejad, H., Schoevers, E.J., Daemen, I.J., Zijlstra, C., Colenbrander, B., Fink-Gremmels, J., *et al.* (2007). Exposure of Oocytes to the Fusarium Toxins Zearalenone and Deoxynivalenol Causes Aneuploidy and Abnormal Embryo Development in Pigs, *Biology of Reproduction*, 77, 840–847.
- Mallmann, C.A. (2006). *Critérios para selecção de um bom sequestrante de micotoxinas*. In: Conferência APINCO, Santos (pp. 358), Anais, Santos: FACTA – Fundação APINCO de ciência e tecnologia.
- Marques, M. (2007). Validação Interna dos Métodos de Determinação de Deoxinivalenol e Zearalenona por HPLC com Purificação por Colunas de Imunoafinidade (Pesquisa de Deoxinivalenol e Zearalenona em Milhos e Alimentos Compostos para Animais). Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior Técnico para obtenção do grau de licenciatura em engenharia química, orientada por Hermínia Marina Martins, Lisboa.
- Marques, M., Martins, H.M., Costa, J.M., Bernardo, F. (2008, Janeiro). *Incidence of Fusarium toxins in feeds marketed in Portugal*. In: Proceedings 5<sup>th</sup> Fusarium Toxin Forum 10–11, Brussels, Belgium.

- Martins, H.M. (1987). Relatório de actividades. Tese apresentada ao Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV) para obtenção de acesso à categoria de Assistente de Investigação, orientada por António Martins Mendes, Lisboa.
- Martins, H.M. (1994). Interações Bióticas na Aflatoxinogénese. Tese de Dissertação apresentada ao Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV) para obtenção de acesso à categoria de Investigadora Auxiliar, orientada por Vera Atalaia, Lisboa.
- Martins, H.M. (2003, Maio). *Occurrence of Aflatoxins in Raw materials and in feedstuffs in Portugal 2000-2002*. Comunicação apresentada no Congresso de Protecção Alimentar, Monte da Caparica, 30.
- Martins, M.L., & Martins, H.M. (2001). *Mycoflora and mycotoxins incidence in raw material (1996 – 2000)*. Comunicação apresentada no Congresso Nacional de Microbiologia – Micro 2001, Póvoa do Varzim.
- Martins, H.M., Guerra, M., & Bernardo, F. (2006). Zearalenone, Deoxynivalenol and Fumonisin in mixed-feed for laying hens, *Mycotoxin Research*, 4, 206–210.
- Martins, H.M., Guerra, M., & Bernardo, F. (2007). Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow's feed over 10 years in Portugal (1995-2004), *Revista Iberoamericana de Micologia*, 24, 69-71.
- Martins, H.M., Marques, M., Almeida, I., Guerra, M.M., & Bernardo, F. (2008). Mycotoxin in feed stuff in Portugal: an overview. *Mycotoxin Research*, 24, 19–23.
- Melo dos Santos, V., Dorner, J.W., & Carreira, F. (2002). Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage, *Mycopathologia*, 156, 133–138.
- Mikami, O., Yamaguchi, H., Murata, H., Nakajima, Y., & Miyazaki, S. (2010, Junho). Induction of apoptotic lesions in liver and lymphoid tissues and modulation of cytokine mRNA expression by acute exposure to deoxynivalenol in piglets, *Journal of Veterinary Science*, 11(2), 107–113.
- Mirocha, C.J., Christensen, C.M., & Nelson, G.H. (1971). *Microbial toxins, Algal and Fungal Toxins*. In: S. Kadis, A. Ciegler and S.S. Ajl (Eds, vol. VII), Academic Press, New York, London.

- Mirocha, C.J., & Christensen, C. M. (1974). Fungus metabolites toxic to animals. *Annual review of phytopathology*, 12, 303-329.
- Molard, D.R. (1986, Mai). *Microbiologie des produits a Humité intermediaire et des produits deshydrates*. Comunicação apresentada no Curso Internacional de Microbiologia dos Alimentos, Instituto Pasteur, Lile.
- Monbaliu, S., Poucke, C.V., Detavernier, C., Dumoulin, F., Van De Velde, M., Schoeters, E., *et al.* (2010). Occurrence of Mycotoxins in Feed as Analyzed by a Multi-Mycotoxin LC-MS/MS Method, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58 (1), 66–71.
- Montagna, M.T., Napoli, C., Giglio, O., Latta, R., & Barbuti, G. (2008). Occurrence of Aflatoxin M1 in Dairy Products in Southern Italy, *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 2614-2621.
- Nagy, C.M., Fejer, S.N., Berek, L., Molnar, J., Viskolcz, B. (2005). Hydrogen bondings in deoxynivalenol (DON) conformations – a density functional study. *Journal of Molecular Structure*, 726, 55–59.
- Nasri, T., Bosch, R.R., Voorde, S., & Fink-Gremmels, J. (2006). Differential induction of apoptosis by type A and B trichothecenes in Jurkat T-lymphocytes, *Toxicology In Vitro*, 20, 832–840.
- Norma Portuguesa NP3277-2. (2002). *Regras gerais para a contagem de bolores e leveduras a 25 °C*, Lisboa.
- O’Brien, E., & Dietrich, D. (2004). *Mycotoxins Affecting the kidney*: In: Hook *et al.* (Eds.) *Toxicology of the kidney*, Boca Raton (pp. 895-936). Acedido a 26 de Março de 2011 em: [http://kops.ub.uni-konstanz.de/volltexte/2008/4973/pdf/OBrien\\_2005895ff\\_Myco\\_toxins.pdf](http://kops.ub.uni-konstanz.de/volltexte/2008/4973/pdf/OBrien_2005895ff_Myco_toxins.pdf).
- Okoye, J.O.A., Gugnani, H.C., & Okeke, C.N. (1990). Clinical and pathological features of *Aspergillus fumigatus* infection in poultry in Southern Nigeria. *Revue d Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, 42, 153-154.

- Oliveira, G.R. (2006). Análises micológicas e micotoxicológicas de rações de frangos de corte no município de São José do Vale do Rio Preto – RJ. Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de Veterinária para obtenção grau de *Magister Scientiae* em Microbiologia Veterinária, orientada por Carlos Rosa, Brasil.
- Onji, Y., Aoki, Y., Tani, N., Umebayashi, K., Kitada, Y., & Dohi, Y. (1998, Julho 31). Direct analysis of several fusarium mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 815, 59-65.
- Park, D.L., Lee, L.S., Price, R.L., & Pohland, A.E. (1988). A review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation, *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 71, 685-703.
- Paterson, R. R. M., & Bridge, P. D. (1994). *Biochemical techniques for filamentous fungi*. Comunicação apresentada no Centro Internacional de Agricultura e Biociência, Wallingford, United Kingdom.
- Payne, G.A.(1992). Aflatoxins in maize. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10: 423-440.
- Peito, M.A.P. (1993). *Estrutura e fisiologia dos fungos*. Comunicação apresentada no Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI), Unidade de Microbiologia Alimentar do DTIA.
- Peraica, M., Radić, B., Lucić, A., & Pavlović, M. (1999). *Toxic effects of mycotoxins in humans*. *Bulletin of the World Health Organization*, 77, 754-766.
- Pereyra, C.M., Cavaglieri, L.R., Chiacchiera, S.M., & Dalcero, A.M. (2010). Fungi and Mycotoxins in Feed Intended for Sows at Different Reproductive Stages in Argentina, *Veterinary Medicine International*, Volume 2010, Artigo nº 569108.
- Pestka, J.J., Bondy, J.S. (1990). Alterations of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68, 1009–1016.
- Pestka, J.J., Zhou, H.R., Moon, Y., & Chung, Y.J. (2004). Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicology Letters*, 153, 61–73.
- Pestka, J.J., & Smolinski, A.T. (2005). Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 8, 39–69.

- Pestka, J., & Zhou, H.R. (2006). Toll-like receptor priming sensitizes macrophages to proinflammatory cytokine gene induction by deoxynivalenol and other toxicants. *Society of Toxicology*, 92, 445–455.
- Pestka, J.J. (2007). Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 283–298.
- Phuong, N. (2010). *Mycotoxins contamination in maize kernels in vietnam and effects of feed additives on reducing fumonisin impacts in pigs*, Comunicação apresentada em Nong Lam University, Department of Animal Nutrition, Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Pier, A.C., Richard, J.L., & Cyzewski, S.J. (1980). Implications of mycotoxins in animal disease. *Journal American Veterinary Medicine Association*, 176, 719-724.
- Pinton, P., Accensi, F., Beauchamp, E., Cossalter, A.M., Callu, P., Grosjean, F., *et al.* (2008, Abril). Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. *Toxicology Letters*, 177(3), 215-22.
- Pinton, P., Braicu, C., Nougayrede, J.P., Laffitte, J., Taranu, I., & Oswald, I.P. (2010, Novembro). Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Journal of Nutrition*, 140(11), 1956-62.
- Pitt, J.I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, 38, 17-22.
- Prado, G., Madeira, J.E., Morais, V.A., Oliveira, M.S., Souza, R.A., *et al.*, (2011, Junho). Reduction of Aflatoxin B(1) in Stored Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) Using *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Food Protection*, 74(6), 1003-1006.
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., & Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984–991.
- Purdue University. (2001). Chemical structure of deoxynivalenol (vomitoxin), a mycotoxin. Acedido a 24 de Outubro de 2010 em <http://www.ces.purdue.edu/pork/clipart/part.htm>.
- Quinta, L.M. (1978, Julho/Dezembro). Aspecto micológico do controlo de qualidade dos alimentos compostos e respectivas matérias-primas. *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias*, 73(447/48), 101-126.

- Reinhard, H., & Zimmerli, B.J. (1999). Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. *Journal of Chromatography A*, 862, 147-159.
- Rhodes, J.C., & Brakhage, A.A. (2006). Molecular determinants of virulence in *Aspergillus fumigatus*. In: Heitman, J., Filler, S.G., Edwards, J.E., Mitchell, A.P. (eds) *Molecular principles of fungal pathogenesis*. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 333-345.
- Richard, J.L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 3-10.
- Rodriguez-Herrera, R., Waniska, R.D., & Rooney, W.L. (1999). Antifungal proteins and grain mold resistance in sorghum with nonpigmented testa. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 47, 4802-4806.
- Rosset, R. (1986). *Les Viandes Fraiches conditionnées ou non: Microbiologie – Analyse*. Comunicação apresentada no Curso Internacional de Microbiologia dos Alimentos, Instituto Pasteur, Lile, 8.
- Rotter, B.A., Thompson, B.K., Lessard, M., Trenholm, H.L., & Tryphonas, H. (1994). Influence of Low-Level Exposure to *Fusarium* Mycotoxins on Selected Immunological and Hematological Parameters in Young Swine. *Toxicological Sciences*, 23(1), 117-124.
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B., & Pestka, J.J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin), *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48, 1–34.
- Santin, E. (2005). *Mould growth and mycotoxin production*. In: Diaz, D. (Ed.), *The Mycotoxin Blue Book*, 225 -234.
- Santos, I.M., Venâncio, A. & Lima, N. (1998). Fungos contaminantes na indústria alimentar. *Micoteca da Universidade do Minho – Centro de Engenharia Biológica*, Braga.
- Saubolle, M.A. (2000). Fungal pneumonias. *Seminars in Respiratory Infections Journal*, 15, 162-177.

- Schiefer, H. B. (1986). Health effects from mycotoxins (volatile or absorbed to particulates): a review of the relevant data in animal experiments. In: Health and Welfare Canada Working Group on Fungi and Indoor Air (ed.), *Significance of fungi in indoor air: report of a Working Group*, Canada, Ottawa.
- Scott, P.M. (1993). Mini review fumonisins. *International Journal of Food Microbiology* 18, 257–270.
- Scott, P.M. (1995). Mycotoxin methodology. *Food Additives & Contaminants*, 12(3), 395-403.
- Scudamore, K.A., & Livesey, T. (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 1–17.
- Sewram, V., Mshicileli, N., Shephard, G.S., Vismer, H.F., Rheeder, J.P., Lee, Y., et al. (2005). Production of Fumonisin B and C by several *Fusarium* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 4861-4866.
- Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G., & Gelderblom, C.A. (1990). Quantitative determination of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 13, 2077-2087.
- Shryock, T.R., Klink, P.R., & Readnour, C.E. (1994). Effect of bentonite incorporated in a feed ration with tilmicosin in the prevention of induced *Mycoplasma gallisepticum* airsacculitis in broiler chickens. *Avian Diseases*, 38, 501-505.
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., & Kizek, R. (2010). Deoxynivalenol and its toxicity, *Interdisciplinary Toxicology*, 3, 101-106.
- Stob, M., Baldwin, R.S., Tuite, J., Andrews, F.N., & Gillette, K.G. (1962, Dezembro 29). Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature*, 196, 1318.
- Sugiyama, K., Hiraoka, H., & Sugita-Konishi, Y. (2008). Aflatoxin M1 contamination in raw bulk milk and the presence of aflatoxin B1 in corn supplied to dairy cattle in Japan, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 49(5), 352-5.
- Suzuki, T., Kurisu, M., Nose, N., & Watanabe, A. (1981). Determination of butenolide (Fusarium toxin) by gas chromatography with an electron-capture detector, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 22(3), 197-202.

- Tiemann, U., & Dänicke, S. (2007, Março). In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. *Food Additives and Contaminants*, 24(3), 306-14.
- Torrado, E. (2007). Caracterização do micobiota em milhos e alimentos compostos para suínos. Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Agronomia- Universidade Técnica de Lisboa para obtenção do grau de Licenciado em Biologia, orientada por Hermínia Marina Martins, Lisboa.
- Trenholm, H.L., Hamilton, R.M., Friend, D.W., Thompson, B.K., Hartin, K.E. (1984). Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat: effects on swine, poultry, and dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185, 527–531.
- Turner, N., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review, *Analytica Chimica Acta*, 632, 168–180.
- Ueno, Y. (1977). In: Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W. & Mehlman M.A. (eds) *Mycotoxins in human and animal health*, Pathotox Publishers Inc., Illinois, 189.
- União Europeia, Recomendação (CE) Nº 576/2006 da Comissão de 17 de Agosto, Jornal Oficial da União Europeia, L 2229/7 – 229/9.
- União Europeia, Regulamento (CE) Nº 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro de 2006, L 70/12 – 70/34, Jornal Oficial da União Europeia.
- Universidade Federal do Paraná (UFPR). (2008). Processos fermentativos. Trabalho académico apresentado ao departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Urry, W.H., Wehrmeister, H.L., Hodge, E.B., & Hidy, P.H. (1966). The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*, 3109-3114.
- Vekiru, E., Hametner, C., Mitterbauer, R., Rechthaler, J., Adam, G., Schatzmayr, G., et al., (2010, Abril). Cleavage of Zearalenone by *Trichosporon* mycotoxinivorans to a Novel Nonestrogenic Metabolite, *Applied And Environmental Microbiology*, 76 (7), 2353–2359.

- Veldman, A., Borggreve, G.J., Mulders, E.J., & Van De Lagemaat, D. (1992). Occurrence of the mycotoxins ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol in feed components. *Food Additive and Contaminants*, 6, 647–655.
- Vesonder, R., Haliburton, J., Stubblefield, R., Gilmore, W., & Peterson, S. (1991). *Aspergillus flavus* and aflatoxins B1, B2, and M1 in corn associated with equine death, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 20, 151-153.
- Vijayan, S., & Kirti, P.B. (2011, Maio 17). Mungbean plants expressing BjNPR1 exhibit enhanced resistance against the seedling rot pathogen, *Rhizoctonia solani*, *Transgenic Research*.
- Voorsluys T. (2010). Estratégias no combate às micotoxinas In: <http://www.nftalliance.com.br/estrat-gias-no-combate-das-micotoxinas/>, Acedido em 30 de Maio de 2011 em <http://www.nftalliance.com.br/estrat-gias-no-combate-das-micotoxinas/>.
- Voss, K.A., Bacon, C.W., Meredith, F.I., & Norred, W.P. (1996). Comparative subchronic toxicity studies of nixtamalized and water-extracted *Fusarium moniliforme* culture material, *Food and Chemical Toxicology*, 34, 623-632.
- Waché, Y.J., Valat, C., Postollec, G., Bougeard, S., Burel, C., Oswald, I.P., et al., (2009, Janeiro). Impact of deoxynivalenol on the intestinal microflora of pigs, *International Journal of Molecular Sciences*, 10(1), 1-17.
- Wiederhold, N.P., Lewis, R.E., Kontoyiannis, D.P. (2003). Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies. *Pharmacotherapy*, 23, 1592-1610.
- World Health Organization (WHO). (2002). *Evaluation of Certain Mycotoxins in Food*, Série de Relatórios Técnicos, 906, Geneva, Suíça.
- Yoshizawa, T., & Morooka, N. (1973). Deoxynivalenol and its monoacetate: new trichothecene mycotoxins from moldy barley. *Agriculture and Biological Chemistry*, 37, 2933-2934.
- Young, J.C., & Games, D.E. (1994). Analysis of *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy, *Journal of Chromatography A*, 663, 211-218.

- Zhou, H.R., Jia, Q., & Pestka, J.J. (2005). Ribotoxic stress response to the trichothecene deoxynivalenol in the macrophage involves the SRC family kina Hck, *Society of Toxicology*, 85, 916–926.
- Zhou, S.M., Jiang, L.P., Geng, C.Y., Cao, J., & Zhong, L.F. (2010, Fevereiro). Patulin-induced oxidative DNA damage and p53 modulation in HepG2 cells. *Toxicon*, 55(2-3), 390-5.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2006, Janeiro). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1-18.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., & Mañes, J. (2007, Janeiro). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1),1-18.
- Zipfel, P.F., Skerka, C., Kupka, D., & Luo, S. (2011, Maio). Immune escape of the human facultative pathogenic yeast *Candida albicans*: The many faces of the Candida Pra1 protein, *International Journal of Medical Microbiology*.

## **APÊNDICES**

**Apêndice A – Resultados da análise micológica efectuada em 55 amostras de alimentos compostos para suínos (Resultados apresentados em UFC/g).**

| Amostra | Leveduras           | <i>Fusarium</i><br>spp. | <i>A.</i><br><i>glaucus</i> | <i>A. niger</i>     | <i>A. flavus</i>    | <i>A.</i><br><i>candidus</i> | <i>A. terreus</i> | <i>Penicillium</i><br>spp. | <i>Mucor</i><br>spp. | <i>Absidia</i><br>spp. | Total               |
|---------|---------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|-------------------|----------------------------|----------------------|------------------------|---------------------|
| 1       | 0                   | 2.8×10 <sup>4</sup>     | 0                           | 0                   | 1.4×10 <sup>3</sup> | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 2.9×10 <sup>4</sup> |
| 2       | 0                   | 0                       | 0                           | 0                   | 0                   | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 0                   |
| 3       | 8.0×10 <sup>2</sup> | 1.1×10 <sup>4</sup>     | 0                           | 0                   | 2.0×10 <sup>2</sup> | 2.0×10 <sup>3</sup>          | 0                 | 6.0×10 <sup>2</sup>        | 0                    | 2.0×10 <sup>2</sup>    | 1.4×10 <sup>4</sup> |
| 4       | 0                   | 0                       | 0                           | 0                   | 0                   | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 0                   |
| 5       | 4.0×10 <sup>2</sup> | 0                       | 0                           | 0                   | 0                   | 6.0×10 <sup>3</sup>          | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 6.4×10 <sup>3</sup> |
| 6       | 3.4×10 <sup>3</sup> | 0                       | 0                           | 0                   | 0                   | 1.5×10 <sup>4</sup>          | 0                 | 2.0×10 <sup>2</sup>        | 0                    | 0                      | 1.9×10 <sup>4</sup> |
| 7       | 6.0×10 <sup>2</sup> | 7.8×10 <sup>3</sup>     | 0                           | 0                   | 0                   | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 8.4×10 <sup>3</sup> |
| 8       | 1.0×10 <sup>3</sup> | 1.8×10 <sup>4</sup>     | 0                           | 0                   | 1.4×10 <sup>3</sup> | 8.0×10 <sup>2</sup>          | 0                 | 0                          | 8.0×10 <sup>2</sup>  | 0                      | 2.2×10 <sup>4</sup> |
| 9       | 0                   | 0                       | 0                           | 0                   | 0                   | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 0                   |
| 10      | 6.0×10 <sup>2</sup> | 3.0×10 <sup>4</sup>     | 0                           | 0                   | 2.0×10 <sup>2</sup> | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 3.1×10 <sup>4</sup> |
| 11      | 0                   | 2.3×10 <sup>3</sup>     | 0                           | 0                   |                     | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 2.3×10 <sup>3</sup> |
| 12      | 1.2×10 <sup>2</sup> | 2.1×10 <sup>3</sup>     | 0                           | 0                   | 1.0×10 <sup>2</sup> | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 2.3×10 <sup>3</sup> |
| 13      | 0                   | 2.5×10 <sup>3</sup>     | 0                           | 0                   | 2.0×10 <sup>2</sup> | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 2.7×10 <sup>3</sup> |
| 14      | 0                   | 2.6×10 <sup>3</sup>     | 1.2×10 <sup>2</sup>         | 0                   | 3.0×10 <sup>2</sup> | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 3.0×10 <sup>3</sup> |
| 15      | 1.4×10 <sup>2</sup> | 1.2×10 <sup>2</sup>     | 2.3×10 <sup>2</sup>         | 0                   | 1.2×10 <sup>3</sup> | 2.3×10 <sup>2</sup>          | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 2.0×10 <sup>3</sup> |
| 16      | 0                   | 1.2×10 <sup>3</sup>     | 2.1×10 <sup>2</sup>         | 0                   | 5.6×10 <sup>2</sup> | 1.5×10 <sup>2</sup>          | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 2.1×10 <sup>3</sup> |
| 17      | 0                   | 1.5×10 <sup>3</sup>     | 5.6×10 <sup>2</sup>         | 1.2×10 <sup>2</sup> | 4.5×10 <sup>2</sup> | 1.6×10 <sup>2</sup>          | 0                 | 0                          | 0                    | 1.0×10 <sup>2</sup>    | 2.9×10 <sup>3</sup> |
| 18      | 2.0×10 <sup>2</sup> | 0                       | 4.5×10 <sup>2</sup>         | 3.0×10 <sup>1</sup> | 2.1×10 <sup>2</sup> | 1.4×10 <sup>2</sup>          | 0                 | 3.0×10 <sup>2</sup>        | 0                    | 0                      | 1.3×10 <sup>3</sup> |
| 19      | 2.3×10 <sup>2</sup> | 0                       | 0                           | 2.0×10 <sup>1</sup> | 3.2×10 <sup>2</sup> | 0                            | 0                 | 2.0×10 <sup>1</sup>        | 0                    | 2.0×10 <sup>2</sup>    | 7.9×10 <sup>2</sup> |
| 20      | 2.2×10 <sup>2</sup> | 1.5×10 <sup>3</sup>     | 0                           | 5.0×10 <sup>1</sup> | 1.5×10 <sup>2</sup> | 0                            | 0                 | 1.3×10 <sup>2</sup>        | 0                    | 0                      | 2.1×10 <sup>3</sup> |
| 21      | 0                   | 2.2×10 <sup>3</sup>     | 0                           | 6.0×10 <sup>1</sup> | 1.6×10 <sup>2</sup> | 0                            | 0                 | 2.3×10 <sup>2</sup>        | 0                    | 30×10 <sup>1</sup>     | 2.7×10 <sup>3</sup> |
| 22      | 0                   | 2.3×10 <sup>3</sup>     | 0                           | 0                   | 0                   | 0                            | 0                 | 2.1×10 <sup>3</sup>        | 0                    | 0                      | 4.4×10 <sup>3</sup> |
| 23      | 0                   | 3.0×10 <sup>4</sup>     | 0                           | 0                   | 0                   | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 2.0×10 <sup>1</sup>    | 3.0×10 <sup>4</sup> |
| 24      | 0                   | 4.0×10 <sup>4</sup>     | 0                           | 0                   | 0                   | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 1.0×10 <sup>1</sup>    | 4.0×10 <sup>4</sup> |
| 25      | 1.4×10 <sup>2</sup> | 3.2×10 <sup>3</sup>     | 0                           | 0                   | 1.4×10 <sup>2</sup> | 1.6×10 <sup>2</sup>          | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | 3.6×10 <sup>3</sup> |

| Amostra | Leveduras         | <i>Fusarium</i><br>spp. | <i>A.</i><br><i>glaucus</i> | <i>A. niger</i>   | <i>A. flavus</i>  | <i>A.</i><br><i>candidus</i> | <i>A. terreus</i> | <i>Penicillium</i><br>spp. | <i>Mucor</i><br>spp. | <i>Absidia</i><br>spp. | Total             |
|---------|-------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|----------------------------|----------------------|------------------------|-------------------|
| 26      | $1.5 \times 10^2$ | $3.2 \times 10^4$       | 0                           | 0                 | $1.5 \times 10^2$ | $1.4 \times 10^2$            | $1.2 \times 10^2$ | 0                          | 0                    | 0                      | $3.3 \times 10^4$ |
| 27      | $1.2 \times 10^2$ | 0                       | $1.2 \times 10^2$           | 0                 | $6.3 \times 10^2$ | $1.8 \times 10^2$            | $3.0 \times 10^1$ | 0                          | $1.0 \times 10^1$    | 0                      | $1.1 \times 10^3$ |
| 28      | $1.2 \times 10^2$ | $5.6 \times 10^4$       | $1.2 \times 10^2$           | 0                 | $2.1 \times 10^2$ | $1.9 \times 10^2$            | $2.1 \times 10^2$ | 0                          | 0                    | 0                      | $5.7 \times 10^4$ |
| 29      | 0                 | $6.5 \times 10^4$       | $3.2 \times 10^2$           | 0                 | $3.0 \times 10^2$ | $1.2 \times 10^2$            | $5.2 \times 10^2$ | 0                          | $1.0 \times 10^1$    | 0                      | $6.6 \times 10^4$ |
| 30      | 0                 | $2.6 \times 10^3$       | 0                           | 0                 | $2.0 \times 10^2$ | $3.2 \times 10^2$            | 0                 | 0                          | $1.0 \times 10^1$    | 0                      | $3.1 \times 10^3$ |
| 31      | $3.0 \times 10^2$ | $3.2 \times 10^4$       | 0                           | 0                 | 0                 | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | $3.2 \times 10^4$ |
| 32      | $2.0 \times 10^2$ | $5.6 \times 10^4$       | 0                           | 0                 | 0                 | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | $5.6 \times 10^4$ |
| 33      | $1.5 \times 10^2$ | $4.5 \times 10^3$       | 0                           | 0                 | 0                 | 0                            | $1.0 \times 10^1$ | 0                          | 0                    | 0                      | $4.7 \times 10^3$ |
| 34      | $1.4 \times 10^2$ | $6.3 \times 10^4$       | 0                           | 0                 | $1.5 \times 10^2$ | 0                            | $2.0 \times 10^1$ | 0                          | 0                    | $1.0 \times 10^2$      | $6.3 \times 10^4$ |
| 35      | $1.6 \times 10^2$ | $2.5 \times 10^4$       | 0                           | 0                 | $1.6 \times 10^2$ | 0                            | $3.0 \times 10^1$ | 0                          | 0                    | $1.0 \times 10^2$      | $2.5 \times 10^4$ |
| 36      | $2.0 \times 10^2$ | $4.5 \times 10^4$       | 0                           | 0                 | $1.6 \times 10^2$ | 0                            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | $4.5 \times 10^4$ |
| 37      | $3.0 \times 10^2$ | $2.3 \times 10^4$       | $1.2 \times 10^2$           | 0                 | $2.0 \times 10^2$ | 0                            | 0                 | $1.2 \times 10^2$          | 0                    | 0                      | $2.4 \times 10^4$ |
| 38      | 0                 | $1.2 \times 10^5$       | $3.2 \times 10^2$           | 0                 | $3.0 \times 10^2$ | $3.0 \times 10^2$            | 0                 | $1.2 \times 10^2$          | 0                    | 0                      | $1.2 \times 10^5$ |
| 39      | 0                 | $2.5 \times 10^4$       | $1.4 \times 10^2$           | 0                 | $2.1 \times 10^2$ | $2.0 \times 10^2$            | 0                 | $1.3 \times 10^2$          | 0                    | 0                      | $2.6 \times 10^4$ |
| 40      | 0                 | $2.6 \times 10^4$       | 0                           | 0                 | $3.0 \times 10^2$ | $1.0 \times 10^2$            | 0                 | $1.0 \times 10^2$          | 0                    | 0                      | $2.7 \times 10^4$ |
| 41      | 0                 | $5.5 \times 10^4$       | 0                           | $2.0 \times 10^1$ | $3.0 \times 10^1$ | $1.0 \times 10^2$            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | $5.6 \times 10^4$ |
| 42      | $1.4 \times 10^2$ | $3.2 \times 10^3$       | 0                           | $1.3 \times 10^2$ | $2.0 \times 10^1$ | $1.0 \times 10^2$            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | $3.6 \times 10^3$ |
| 43      | $1.2 \times 10^2$ | $3.3 \times 10^4$       | 0                           | 0                 | $2.0 \times 10^1$ | $2.0 \times 10^2$            | 0                 | 0                          | $3.0 \times 10^1$    | 0                      | $3.3 \times 10^4$ |
| 44      | $1.5 \times 10^2$ | $4.6 \times 10^3$       | 0                           | 0                 | $1.0 \times 10^1$ | $2.3 \times 10^2$            | $1.0 \times 10^1$ | 0                          | $2.0 \times 10^1$    | 0                      | $5.1 \times 10^3$ |
| 45      | $1.6 \times 10^2$ | $5.6 \times 10^2$       | 0                           | 0                 | 0                 | $2.3 \times 10^2$            | $2.0 \times 10^1$ | 0                          | 0                    | 0                      | $9.7 \times 10^2$ |
| 46      | 0                 | $2.7 \times 10^3$       | 0                           | 0                 | $1.0 \times 10^1$ | $3.2 \times 10^2$            | $3.0 \times 10^1$ | $1.2 \times 10^2$          | 0                    | 0                      | $3.2 \times 10^3$ |
| 47      | 0                 | $5.1 \times 10^3$       | 0                           | 0                 | $1.0 \times 10^2$ | $3.2 \times 10^2$            | 0                 | $1.0 \times 10^2$          | 0                    | 0                      | $5.6 \times 10^3$ |
| 48      | 0                 | $6.0 \times 10^2$       | 0                           | 0                 | $1.5 \times 10^2$ | $1.0 \times 10^2$            | 0                 | $1.0 \times 10^2$          | 0                    | 0                      | $9.5 \times 10^2$ |
| 49      | $1.4 \times 10^2$ | $2.3 \times 10^3$       | 0                           | 0                 | $1.0 \times 10^2$ | $1.0 \times 10^2$            | 0                 | 0                          | 0                    | 0                      | $2.6 \times 10^3$ |
| 50      | $1.2 \times 10^2$ | $4.6 \times 10^3$       | 0                           | 0                 | $1.3 \times 10^2$ | $1.2 \times 10^2$            | 0                 | $1.0 \times 10^2$          | 0                    | 0                      | $5.1 \times 10^3$ |
| 51      | $1.2 \times 10^2$ | $7.9 \times 10^3$       | 0                           | 0                 | $1.2 \times 10^2$ | $1.2 \times 10^2$            | 0                 | $2.0 \times 10^1$          | 0                    | 0                      | $8.3 \times 10^3$ |
| 52      | $1.2 \times 10^2$ | $5.5 \times 10^3$       | 0                           | $2.0 \times 10^1$ | 0                 | $2.0 \times 10^3$            | 0                 | $3.0 \times 10^1$          | 0                    | 0                      | $7.6 \times 10^3$ |
| 53      | $5.0 \times 10^1$ | 0                       | 0                           | $3.0 \times 10^1$ | 0                 | $3.2 \times 10^3$            | 0                 | $3.0 \times 10^1$          | 0                    | 0                      | $3.3 \times 10^3$ |
| 54      | $6.0 \times 10^1$ | $2.3 \times 10^2$       | $1.2 \times 10^2$           | $1.0 \times 10^1$ | 0                 | $1.2 \times 10^3$            | $3.0 \times 10^1$ | $2.0 \times 10^2$          | $1.0 \times 10^1$    | 0                      | $1.9 \times 10^3$ |
| 55      | $3.0 \times 10^1$ | 0                       | 0                           | 0                 | $1.2 \times 10^2$ | 0                            | $3.0 \times 10^1$ | 0                          | $1.0 \times 10^1$    | 0                      | $1.9 \times 10^2$ |

**Apêndice B – Resultados comparativos entre os níveis de *Fusarium* spp. e os níveis de ZEA e DON quantificados.**

| Amostra | <i>Fusarium</i><br>spp. (UFC/g) | ZEA (µg/kg)         | DON (µg/kg)         |
|---------|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| 1       | 2.8×10 <sup>4</sup>             | 0                   | 3.0×10 <sup>2</sup> |
| 2       | 0                               | 0                   | 0                   |
| 3       | 1.1×10 <sup>4</sup>             | 0                   | 0                   |
| 4       | 0                               | 0                   | 9.0×10 <sup>2</sup> |
| 5       | 0                               | 0                   | 0                   |
| 6       | 0                               | 0                   | 0                   |
| 7       | 7.8×10 <sup>3</sup>             | 0                   | 2.7×10 <sup>2</sup> |
| 8       | 1.8×10 <sup>4</sup>             | 0                   | 0                   |
| 9       | 0                               | 4.7×10 <sup>1</sup> | 6.0×10 <sup>2</sup> |
| 10      | 3.0×10 <sup>4</sup>             | 0                   | 0                   |
| 11      | 2.3×10 <sup>3</sup>             | 1.0×10 <sup>1</sup> | 1.0×10 <sup>2</sup> |
| 12      | 2.1×10 <sup>3</sup>             | 1.5×10 <sup>1</sup> | 0                   |
| 13      | 2.5×10 <sup>3</sup>             | 5.4×10 <sup>1</sup> | 0                   |
| 14      | 2.6×10 <sup>3</sup>             | 1.9×10 <sup>1</sup> | 0                   |
| 15      | 1.2×10 <sup>2</sup>             | 0                   | 0                   |
| 16      | 1.2×10 <sup>3</sup>             | 6.1                 | 0                   |
| 17      | 1.5×10 <sup>3</sup>             | 2.2×10 <sup>1</sup> | 0                   |
| 18      | 0                               | 8.6                 | 0                   |
| 19      | 0                               | 1.4×10 <sup>1</sup> | 0                   |
| 20      | 1.5×10 <sup>3</sup>             | 1.6×10 <sup>1</sup> | 0                   |
| 21      | 2.2×10 <sup>3</sup>             | 4.5×10 <sup>1</sup> | 0                   |
| 22      | 2.2×10 <sup>3</sup>             | 0                   | 0                   |
| 23      | 3.0×10 <sup>4</sup>             | 1.9×10 <sup>1</sup> | 5.0×10 <sup>2</sup> |
| 24      | 4.0×10 <sup>4</sup>             | 0                   | 0                   |
| 25      | 3.2×10 <sup>3</sup>             | 0                   | 0                   |
| 26      | 3.2×10 <sup>4</sup>             | 3.7×10 <sup>1</sup> | 0                   |
| 27      | 0                               | 1.9×10 <sup>1</sup> | 0                   |
| 28      | 5.6×10 <sup>4</sup>             | 0                   | 0                   |

| Amostra | <i>Fusarium</i><br>spp.(UFC/g) | ZEA (µg/kg)         | DON (µg/kg)         |
|---------|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| 29      | 6.5×10 <sup>4</sup>            | 0                   | 7.0×10 <sup>2</sup> |
| 30      | 2.6×10 <sup>3</sup>            | 0                   | 0                   |
| 31      | 3.2×10 <sup>4</sup>            | 0                   | 0                   |
| 32      | 5.6×10 <sup>4</sup>            | 1.1×10 <sup>1</sup> | 0                   |
| 33      | 4.5×10 <sup>3</sup>            | 0                   | 1.0×10 <sup>2</sup> |
| 34      | 6.6×10 <sup>4</sup>            | 0                   | 0                   |
| 35      | 2.5×10 <sup>4</sup>            | 0                   | 0                   |
| 36      | 4.5×10 <sup>4</sup>            | 0                   | 0                   |
| 37      | 2.3×10 <sup>4</sup>            | 0                   | 0                   |
| 38      | 1.2×10 <sup>5</sup>            | 0                   | 0                   |
| 39      | 2.5×10 <sup>4</sup>            | 8.1                 | 0                   |
| 40      | 2.6×10 <sup>4</sup>            | 1.5×10 <sup>1</sup> | 0                   |
| 41      | 5.5×10 <sup>4</sup>            | 0                   | 0                   |
| 42      | 3.2×10 <sup>3</sup>            | 0                   | 0                   |
| 43      | 3.3×10 <sup>4</sup>            | 1.6×10 <sup>1</sup> | 0                   |
| 44      | 4.6×10 <sup>3</sup>            | 0                   | 0                   |
| 45      | 5.6×10 <sup>2</sup>            | 0                   | 0                   |
| 46      | 2.4×10 <sup>3</sup>            | 0                   | 0                   |
| 47      | 5.1×10 <sup>3</sup>            | 0                   | 0                   |
| 48      | 6.0×10 <sup>2</sup>            | 0                   | 0                   |
| 49      | 2.3×10 <sup>3</sup>            | 0                   | 7.0×10 <sup>2</sup> |
| 50      | 4.6×10 <sup>3</sup>            | 0                   | 9.0×10 <sup>2</sup> |
| 51      | 7.9×10 <sup>3</sup>            | 0                   | 6.0×10 <sup>2</sup> |
| 52      | 5.5×10 <sup>3</sup>            | 0                   | 0                   |
| 53      | 0                              | 0                   | 0                   |
| 54      | 2.3×10 <sup>2</sup>            | 0                   | 9.0×10 <sup>2</sup> |
| 55      | 0                              | 0                   | 7.0×10 <sup>2</sup> |

**Apêndice C – Níveis de contaminação das amostras analisadas, com zearalenona e deoxinivalenol.**

| Amostra | ZEA (µg/kg)       | DON (µg/kg)       |
|---------|-------------------|-------------------|
| 1       | 0                 | $3.0 \times 10^2$ |
| 2       | 0                 | 0                 |
| 3       | 0                 | 0                 |
| 4       | 0                 | $9.0 \times 10^2$ |
| 5       | 0                 | 0                 |
| 6       | 0                 | 0                 |
| 7       | 0                 | $2.7 \times 10^2$ |
| 8       | 0                 | 0                 |
| 9       | $4.7 \times 10^1$ | $6.0 \times 10^2$ |
| 10      | 0                 | 0                 |
| 11      | $1.0 \times 10^1$ | $1.0 \times 10^2$ |
| 12      | $1.5 \times 10^1$ | 0                 |
| 13      | $5.4 \times 10^1$ | 0                 |
| 14      | $1.9 \times 10^1$ | 0                 |
| 15      | 0                 | 0                 |
| 16      | 6.1               | 0                 |
| 17      | $2.2 \times 10^1$ | 0                 |
| 18      | 8.6               | 0                 |
| 19      | $1.4 \times 10^1$ | 0                 |
| 20      | $1.6 \times 10^1$ | 0                 |
| 21      | $4.5 \times 10^1$ | 0                 |
| 22      | 0                 | 0                 |
| 23      | $1.9 \times 10^1$ | $5.0 \times 10^2$ |
| 24      | 0                 | 0                 |
| 25      | 0                 | 0                 |
| 26      | $3.7 \times 10^1$ | 0                 |
| 27      | $1.9 \times 10^1$ | 0                 |
| 28      | 0                 | 0                 |

| Amostra | ZEA (µg/kg)       | DON (µg/kg)       |
|---------|-------------------|-------------------|
| 29      | 0                 | $7.0 \times 10^2$ |
| 30      | 0                 | 0                 |
| 31      | 0                 | 0                 |
| 32      | $1.1 \times 10^1$ | 0                 |
| 33      | 0                 | $1.0 \times 10^2$ |
| 34      | 0                 | 0                 |
| 35      | 0                 | 0                 |
| 36      | 0                 | 0                 |
| 37      | 0                 | 0                 |
| 38      | 0                 | 0                 |
| 39      | 8.1               | 0                 |
| 40      | $1.5 \times 10^1$ | 0                 |
| 41      | 0                 | 0                 |
| 42      | 0                 | 0                 |
| 43      | $1.6 \times 10^1$ | 0                 |
| 44      | 0                 | 0                 |
| 45      | 0                 | 0                 |
| 46      | 0                 | 0                 |
| 47      | 0                 | 0                 |
| 48      | 0                 | 0                 |
| 49      | 0                 | $7.0 \times 10^2$ |
| 50      | 0                 | $9.0 \times 10^2$ |
| 51      | 0                 | $6.0 \times 10^2$ |
| 52      | 0                 | 0                 |
| 53      | 0                 | 0                 |
| 54      | 0                 | $9.0 \times 10^2$ |
| 55      | 0                 | $7.0 \times 10^2$ |

# ANEXOS

## Anexo A – Recomendação N° 576/2006

23.8.2006

PT

Jornal Oficial da União Europeia

L 229/7

### RECOMENDAÇÃO DA COMISSÃO

de 17 de Agosto de 2006

sobre a presença de desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 e HT-2 e fumonisinas em produtos destinados à alimentação animal

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(2006/576/CE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia, nomeadamente o segundo travessão do artigo 211.º,

Considerando o seguinte:

(1) A pedido da Comissão, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESa) adoptou dois pareceres relativos às micotoxinas desoxinivalenol em 2 de Junho de 2004 <sup>(1)</sup>, zearalenona em 28 de Julho de 2004 <sup>(2)</sup>, ocratoxina A em 22 de Setembro de 2004 <sup>(3)</sup> e fumonisinas em 22 de Junho de 2005 <sup>(4)</sup>.

(2) Os referidos pareceres concluíram que as quatro micotoxinas exercem efeitos tóxicos em diversas espécies animais. O desoxinivalenol, a zearalenona e as fumonisinas B1 e B2 transferem-se, apenas de forma muito limitada, dos alimentos para animais para a carne, os ovos e o leite, pelo que os alimentos de origem animal apenas contribuem marginalmente para a exposição total dos seres humanos a estas toxinas. A ocratoxina A pode transferir-se dos alimentos para animais para os alimentos de origem animal, mas as avaliações da exposição indicam que os alimentos de origem animal pouco contribuem para a exposição dos seres humanos à ocratoxina A, por via alimentar.

(<sup>1</sup>) Parecer do Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESa) sobre um pedido da Comissão relacionado com o desoxinivalenol como substância indesejável nos alimentos para animais, adoptado em 2 de Junho de 2004:  
[http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam\\_opinions/478.Par.0005.File.dat/opinion05\\_contam\\_ej73\\_deoxynivalenol\\_v2\\_en1.pdf](http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/478.Par.0005.File.dat/opinion05_contam_ej73_deoxynivalenol_v2_en1.pdf)

(<sup>2</sup>) Parecer do Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESa) sobre um pedido da Comissão relacionado com a zearalenona como substância indesejável nos alimentos para animais, adoptado em 28 de Julho de 2004:  
[http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam\\_opinions/527.Par.0004.File.dat/opinion\\_contam06\\_ej89\\_zearalenone\\_v3\\_en1.pdf](http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/527.Par.0004.File.dat/opinion_contam06_ej89_zearalenone_v3_en1.pdf)

(<sup>3</sup>) Parecer do Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESa) sobre um pedido da Comissão relacionado com a ocratoxina A como substância indesejável nos alimentos para animais, adoptado em 22 de Setembro de 2004:  
[http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam\\_opinions/645.Par.0001.File.dat/opinion\\_contam09\\_ej101\\_ochratoxina\\_en1.pdf](http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/645.Par.0001.File.dat/opinion_contam09_ej101_ochratoxina_en1.pdf)

(<sup>4</sup>) Parecer do Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESa) sobre um pedido da Comissão relacionado com as fumonisinas como substância indesejável nos alimentos para animais, adoptado em 22 de Junho de 2005:  
[http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam\\_opinions/1037.Par.0001.File.dat/contam\\_op\\_ej235\\_fumonisin\\_en1.pdf](http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/1037.Par.0001.File.dat/contam_op_ej235_fumonisin_en1.pdf)

(3) Os dados sobre a presença das toxinas T-2 e HT-2 em produtos destinados a alimentos para animais são, até momento, muito limitados. Além disso, é urgentemente necessário desenvolver e validar um método analítico sensível. Contudo, existem indicações no sentido de a presença das toxinas T-2 e HT-2 em produtos destinados a alimentos para animais poder constituir motivo para preocupação. Por conseguinte, é necessário desenvolver um método analítico sensível, recolher mais dados relativos às ocorrências e reforçar a investigação sobre os factores implicados na presença de T-2 e HT-2 nos cereais e nos produtos à base de cereais, em particular na aveia e nos produtos à base de aveia.

(4) Tendo em consideração as conclusões dos pareceres científicos referidos no considerando 1 e a ausência de dados fiáveis sobre as toxinas T-2 e HT-2, a que acresce a grande variação anual da ocorrência destas micotoxinas, é conveniente recolher mais dados sobre as micotoxinas mencionadas nas diferentes matérias-primas para a alimentação animal e alimentos para animais, além dos dados já disponíveis provenientes dos programas coordenados de controlo relativos a 2002 <sup>(5)</sup>, 2004 <sup>(6)</sup> e 2005 <sup>(7)</sup>.

(5) A fim de orientar os Estados-Membros em matéria de aceitabilidade de cereais e produtos à base de cereais e de alimentos compostos para animais e de evitar disparidades entre os valores aceites pelos diferentes Estados-Membros, bem como o consequente risco de distorção da concorrência, é conveniente recomendar valores de orientação.

(6) Os Estados-Membros devem aplicar os valores de orientação relativos às fumonisinas B1 + B2 apenas a partir de 1 de Outubro de 2007, para coincidirem com as regras estabelecidas pelo Regulamento (CE) n.º 856/2005 da Comissão, de 6 de Junho de 2005, que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no que diz respeito às toxinas *Fusarium* <sup>(8)</sup>.

(<sup>5</sup>) Recomendação 2002/214/CE da Comissão, de 12 de Março de 2002, relativa aos programas coordenados de controlo no domínio da alimentação animal para 2002, nos termos da Directiva 95/53/CE do Conselho (JO L 70 de 13.3.2002, p. 20).

(<sup>6</sup>) Recomendação 2004/163/CE da Comissão, de 17 de Fevereiro de 2004, relativa ao programa coordenado de controlo no domínio da alimentação animal para 2004, nos termos da Directiva 95/53/CE do Conselho (JO L 52 de 21.2.2004, p. 70).

(<sup>7</sup>) Recomendação 2005/187/CE da Comissão, de 2 de Março de 2005, relativa ao programa coordenado de controlo no domínio da alimentação animal para 2005, nos termos da Directiva 95/53/CE do Conselho (JO L 62 de 9.3.2005, p. 22).

(<sup>8</sup>) JO L 143 de 7.6.2005, p. 3.

- (7) Deve ser realizada até 2009 uma avaliação da abordagem, prevista na presente recomendação, em particular no sentido de avaliar o seu contributo para a protecção da sanidade animal. Os dados de acompanhamento obtidos em resultado da presente recomendação permitirão igualmente compreender melhor a variação anual e a presença destas micotoxinas no vasto leque de subprodutos utilizados nos alimentos para animais, factor de primordial importância para adoptar, caso necessário, medidas legislativas suplementares,

RECOMENDA:

- 1) Os Estados-Membros devem, com a participação activa dos operadores do sector dos alimentos para animais, intensificar o acompanhamento da presença de desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A e fumonisinas B1+B2 e das toxinas T-2 e HT-2 nos cereais e nos produtos à base de cereais destinados a alimentos para animais e a alimentos compostos para animais.
- 2) Os Estados-Membros devem assegurar a análise simultânea de amostras destinadas a detectar a presença de desoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, fumonisina B1+B2 e das toxinas T-2 e HT-2, para que se possa avaliar a dimensão da co-ocorrência.
- 3) Os Estados-Membros devem prestar particular atenção à presença das referidas micotoxinas em subprodutos e co-produtos da produção alimentar destinados à alimentação animal.
- 4) Os Estados-Membros devem assegurar que os resultados analíticos são fornecidos regularmente à Comissão para compilação numa base de dados.
- 5) Os Estados-Membros devem assegurar que os valores de orientação fixados no anexo são aplicados para apurar a aceitabilidade de alimentos compostos para animais e de cereais e produtos à base de cereais destinados à alimentação animal. No que diz respeito às fumonisinas B1 + B2, os Estados-Membros devem aplicar os valores de orientação a partir de 1 de Outubro de 2007.
- 6) Os Estados-Membros devem assegurar, em particular, que os operadores do sector dos alimentos para animais utilizam nos seus sistemas de análise de perigos e pontos críticos de controlo (APPCC) <sup>(1)</sup> os valores de orientação referidos no ponto 5, a fim de determinar os limites críticos nos pontos críticos de controlo que separam a aceitabilidade da inaceitabilidade, com vista à prevenção, eliminação e redução dos perigos identificados.

Ao aplicar esses valores de orientação, os Estados-Membros devem ter em consideração o facto de os valores de orientação relativos aos cereais e produtos à base de cereais serem determinados para a espécie animal mais tolerante, pelo que devem ser encarados como valores de orientação superiores.

Quanto aos alimentos para animais destinados às espécies mais sensíveis, os Estados-Membros devem assegurar que os fabricantes de alimentos para animais aplicam valores de orientação inferiores relativamente aos cereais e produtos à base de cereais, tendo em conta o grau de sensibilidade das espécies animais, permitindo a conformidade com os valores de orientação relativos aos alimentos compostos para animais dessas espécies.

Feito em Bruxelas, em 17 de Agosto de 2006.

*Pela Comissão*

Markos KYPRIANOU

*Membro da Comissão*

<sup>(1)</sup> Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho (JO L 35 de 8.2.2005, p. 1).

## ANEXO

## VALORES DE ORIENTAÇÃO

| Micotoxina           | Produtos destinados à alimentação animal                                                                                                   | Valor de orientação em mg/kg (ppm) de alimento para animais para um teor de humidade de 12 % |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Desoxinivalenol      | Matérias-primas para alimentação animal (*)                                                                                                |                                                                                              |
|                      | — Cereais e produtos à base de cereais (**) com excepção dos subprodutos do milho                                                          | 8                                                                                            |
|                      | — Subprodutos do milho                                                                                                                     | 12                                                                                           |
|                      | Alimentos complementares e alimentos completos para animais, com excepção de:                                                              | 5                                                                                            |
|                      | — Alimentos complementares e alimentos completos para suínos                                                                               | 0,9                                                                                          |
| Zearalenona          | — Alimentos complementares e alimentos completos para vitelos (< 4 meses), borregos e cabritos                                             | 2                                                                                            |
|                      | Matérias-primas para alimentação animal (*)                                                                                                |                                                                                              |
|                      | — Cereais e produtos à base de cereais (**) com excepção dos subprodutos do milho                                                          | 2                                                                                            |
|                      | — Subprodutos do milho                                                                                                                     | 3                                                                                            |
|                      | Alimentos complementares e alimentos completos para animais                                                                                |                                                                                              |
|                      | — Alimentos complementares e alimentos completos para leitões e marrãs (porcas jovens)                                                     | 0,1                                                                                          |
|                      | — Alimentos complementares e alimentos completos para porcas e suínos de engorda                                                           | 0,25                                                                                         |
| Ocratoxina A         | — Alimentos complementares e alimentos completos para vitelos, vacas leiteiras, ovelhas (incluindo borregos) e cabras (incluindo cabritos) | 0,5                                                                                          |
|                      | Matérias-primas para alimentação animal (*)                                                                                                |                                                                                              |
|                      | — Cereais e produtos à base de cereais (**) com excepção dos subprodutos do milho                                                          | 0,25                                                                                         |
|                      | Alimentos complementares e alimentos completos para animais                                                                                |                                                                                              |
| Fumonisin<br>B1 + B2 | — Alimentos complementares e alimentos completos para suínos                                                                               | 0,05                                                                                         |
|                      | — Alimentos complementares e alimentos completos para aves de capoeira                                                                     | 0,1                                                                                          |
|                      | Matérias-primas para alimentação animal (*)                                                                                                |                                                                                              |
| Fumonisin<br>B1 + B2 | — milho e produtos à base de milho (***)                                                                                                   | 60                                                                                           |
|                      | Alimentos complementares e alimentos completos para:                                                                                       |                                                                                              |
|                      | — suínos, cavalos (equídeos), coelhos e animais de companhia                                                                               | 5                                                                                            |
|                      | — peixes                                                                                                                                   | 10                                                                                           |
|                      | — aves de capoeira, vitelos (< 4 meses), borregos e cabritos                                                                               | 20                                                                                           |
|                      | — ruminantes adultos (> 4 meses) e martas                                                                                                  | 50                                                                                           |

(\*) Deve ser prestada particular atenção aos cereais e produtos à base de cereais directamente consumidos pelos animais, de modo a assegurar que a sua utilização na ração diária não leva a que o nível de exposição do animal a estas micotoxinas seja superior aos níveis de exposição correspondentes, quando se utilizam apenas alimentos completos na ração diária.

(\*\*) O termo «Cereais e produtos à base de cereais» inclui não apenas as matérias-primas para alimentação animal enumeradas no capítulo 1 «Grãos de cereais, respectivos produtos e subprodutos», da lista não exaustiva das principais matérias-primas para alimentação animal referida na parte B do anexo da Directiva 96/25/CE do Conselho, de 29 de Abril de 1996, relativa à circulação de matérias-primas para alimentação animal (JO L 125 de 23.5.1996, p. 35), mas, também, outras matérias-primas para alimentação animal derivadas de cereais, em particular de forragens de cereais e alimentos grosseiros.

(\*\*\*) O termo «Milho e produtos à base de milho» inclui não apenas as matérias-primas para alimentação animal derivadas do milho, enumeradas no capítulo 1, «Grãos de cereais, respectivos produtos e subprodutos», da lista não exaustiva das principais matérias-primas para alimentação animal referida na parte B do anexo da Directiva 96/25/CE mas, também, outras matérias-primas para alimentação animal derivadas do milho, em particular de forragens de milho e alimentos grosseiros.

**Anexo B – Projecto de Norma Portuguesa NP 3277-2 (2002).**

COPIA DE TRABALHO

# Projecto de Norma Portuguesa

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| GAB. GARANTIA DA QUALIDADE |            |
| RECEBIDO EM                | 14.02.2002 |
| ENTRADA Nº                 | 115        |
| RUBRICA                    | Sensa      |

NP 3277-2

## Microbiologia alimentar

### Regras gerais para contagem de bolores e leveduras a 25 °C

#### Parte 2: Método de referência

Microbiologie alimentaire

Règles generales pour le dénombrement des moisissures et des levures à 25 °C

Partie 2: Méthode de référence

Food microbiology

General rules for counting moulds and yeasts at 25 °C

Part 2: Reference method

ICS  
07.100.30

#### DESCRIPTORIOS

Produtos alimentares; alimentos para animais; microbiologia; métodos de contagem (microbiologia); bolores (alimentos); leveduras; controlo alimentar; meios de cultura; relatórios; bibliografia

#### CORRESPONDÊNCIA

APROVAÇÃO  
2002-11-05

#### INQUÉRITO PÚBLICO

Este projecto de Norma está sujeito a inquérito público durante o prazo de 30 dias conforme indicado na publicação do Instituto Português da Qualidade "Lista Mensal Projectos de Normas". Eventuais críticas ou sugestões devem ser enviadas ao Instituto Português da Qualidade, Serviço de Normalização

ELABORAÇÃO  
CT 61 (DGFCQA)

EDIÇÃO  
Novembro de 2002

CÓDIGO DE PREÇO  
X002

© IPQ reprodução proibida

Instituto Português da **Q**ualidade

Rua António Gão, 2  
PT - 2829-513 CAPARICA PORTUGAL

Tel. (+ 351) 21 294 81 00  
Fax. (+ 351) 21 294 81 01

E-mail: [ipq@mail.ipq.pt](mailto:ipq@mail.ipq.pt)  
URL: [www.ipq.pt](http://www.ipq.pt)

### **Preâmbulo**

A presente Norma visa fornecer as regras gerais para a contagem de bolores e leveduras em géneros alimentícios e em alimentos para animais para os quais não existam normas específicas.

Dada a diversidade destes produtos, pode tornar-se necessário introduzir modificações à presente Norma.

Deve, no entanto, procurar aplicar-se as regras indicadas, só se recorrendo a alterações por razões técnicas bem determinadas.

Os bolores e leveduras, embora apenas considerados como um índice de higiene, podem ser prejudiciais para a saúde pública, humana e veterinária. Aconselha-se pois a identificação, na medida do possível, dos géneros e espécies de bolores que se desenvolvam nos meios de cultura descritos na Norma.

prNP 3277-2  
2002

p. 4 de 8

## 1 Objectivo e campo de aplicação

A presente Norma descreve um método de referência para a contagem de colónias de bolores e leveduras viáveis a 25 °C<sup>(1)</sup> em produtos destinados à alimentação humana e animal.

## 2 Referências normativas

Os documentos a seguir referenciados são indispensáveis para a aplicação da presente Norma. Para as referências datadas aplica-se a edição citada. Para as referências não datadas aplica-se a última edição do documento referenciado (incluindo as emendas).

NP 1828 - Microbiologia alimentar. Colheita de amostras para análise microbiológica.

NP 1829 - Microbiologia alimentar. Preparação da amostra para análise microbiológica.

NP 2079 - Microbiologia alimentar. Regras gerais para análise microbiológica.

EN ISO 6887-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions (ISO 6887-1:1999).

## 3 Definições

Para os fins da presente Norma, entende-se por bolores e leveduras, os microrganismos de cada um destes grupos, revivificáveis nas condições descritas na presente Norma.

## 4 Resumo do processo

Desenvolvimento de bolores e de leveduras em meio de cultura, temperatura e tempo apropriados, utilizando a técnica de sementeira em superfície e a contagem das respectivas colónias.

## 5 Diluentes e meios de cultura

*NOTA: Os meios comercializados podem ser utilizados; neste caso, seguir as prescrições do fabricante.*

### 5.1 Diluentes

Ver a EN ISO 6887-1, e a norma específica para o produto a analisar.

### 5.2 Meios de cultura

5.2.1 Meio gelosado de dicloran, rosa de bengala e cloranfenicol (para todos os produtos independentemente do valor de  $a_w$ )

Composição:

|               |      |
|---------------|------|
| Peptona ..... | 5 g  |
| Dextrose..... | 10 g |

<sup>(1)</sup> Não há inconveniente em que a temperatura de incubação varie entre os 22 °C e os 28 °C.

|                                                                   |         |
|-------------------------------------------------------------------|---------|
| Dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ..... | 1 g     |
| Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ) .....                     | 0,5 g   |
| Dicloran (2,6 Dicloro 4 nitroanilina) .....                       | 0,002 g |
| Rosa de Bengala .....                                             | 0,025 g |
| Ágar-ágar .....                                                   | 15 g    |
| Água .....                                                        | 1000 mL |

## Preparação:

Dissolver os componentes ou o meio completo desidratado na água, aquecendo e agitando até dissolução completa.

Adicionar 200 g de glicerol p.a. e 0,1 g de cloranfenicol.

Ajustar o pH, se necessário, de modo que depois da esterilização este seja de  $5,6 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$ .

Distribuir por frascos de capacidade adequada.

Esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 min.

5.2.2 Meio gelosado de dicloran e glicerol DG18 (produtos com  $a_w < 0,60$ )

## Composição:

|                                                                  |         |
|------------------------------------------------------------------|---------|
| Peptona .....                                                    | 5 g     |
| Dextrose.....                                                    | 10 g    |
| Diidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ..... | 1 g     |
| Sulfato de magnésio ( $\text{Mg SO}_4$ ) .....                   | 0,5 g   |
| Dicloran (2,6 Dicloro 4 nitroanilina).....                       | 0,002 g |
| Ágar-ágar .....                                                  | 15 g    |
| Água .....                                                       | 1000 mL |

## Preparação

Dissolver os componentes ou o meio completo desidratado na água, aquecendo e agitando até dissolução completa.

Adicionar 200 g de glicerol p.a. e 0,1 g de cloranfenicol<sup>(2)</sup>

Ajustar o pH, se necessário, de modo que depois da esterilização este seja de  $5,6 \pm 0,2$  a  $25^\circ\text{C}$ .

<sup>(2)</sup> O cloranfenicol pode ser substituído por clorotetraciclina, numa concentração final no meio de cultura de  $35 \mu\text{g/mL}$ . A solução aquosa de clorotetraciclina é esterilizada por filtração e adicionada ao meio de cultura esterilizado e arrefecido a  $45^\circ\text{C} - 50^\circ\text{C}$ .

Para carnes e produtos cárneos aconselha-se a utilização de dois antibióticos, a oxitetraciclina e a gentamicina na concentração final de  $100 \mu\text{g/mL}$  para cada antibiótico, no meio de cultura. A esterilização da solução de oxitetraciclina é feita por filtração e a da gentamicina por autoclavagem a  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. As soluções de antibiótico são adicionadas ao meio de cultura esterilizado e arrefecido a  $45^\circ\text{C} - 50^\circ\text{C}$ .

prNP 3277-2  
2002

p. 6 de 8

Distribuir por frascos de capacidade adequada.

Esterilizar em autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

## 6 Aparelhos e utensílios

*NOTA: É aceitável a utilização de material descartável em substituição do vidro reutilizável, se as especificações forem similares.*

Material de uso corrente em laboratório de microbiologia (ver NP 2079), nomeadamente:

Placas de Petri de 100 ou 120 mm de diâmetro e cerca de 18 mm de altura, esterilizadas.

## 7 Colheita da amostra

Ver NP 1828 e a norma específica do produto a analisar.

## 8 Preparação da amostra

Ver NP 1829 e a norma específica do produto a analisar.

## 9 Técnica

Na execução da análise, devem seguir-se as regras gerais estabelecidas na NP 2079.

### 9.1 Preparação da suspensão-mãe e das diluições

Ver a NP 3005.

### 9.2 Sementeira

As diluições utilizadas na sementeira dependem do grau de contaminação previsto.

Da suspensão-mãe e de cada uma das diluições a utilizar, caso necessário, retira-se, assepticamente, 1 mL que se distribui à razão de 0,2 mL por placa, em 5 placas de Petri contendo meio de cultura. De seguida, espalha-se bem o inóculo sobre a superfície do meio com o auxílio de um semeador esterilizado.

O tempo decorrido entre o fim da preparação da suspensão-mãe, das diluições, e o momento em que o inóculo entra em contacto com o meio de cultura não deve ultrapassar os 15 minutos, salvo indicações particulares mencionadas na norma específica.

### 9.3 Incubação

Após a sementeira, incubar as placas, invertidas, a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 dias, podendo fazer-se, se necessário, uma contagem antecipada ao 3º ou 4º dia.

Em alguns casos poderá justificar-se uma incubação mais prolongada, o que deverá ser referido no relatório de ensaio.

### 9.4 Contagem de colónias

Após o período de incubação (9.3), a contagem pode ser efectuada com o auxílio de um contador de colónias nas placas da suspensão-mãe ou nas da mais baixa diluição cujo número de colónias, por placa, seja inferior a 150. Se houver dificuldade na contagem de colónias, por invasão de bolores, utilizar as contagens obtidas

ao 3º ou 4º dia de incubação. Neste caso, o número de dias de incubação deve ser referido no relatório de ensaio.

As colónias de bolores e leveduras são contadas separadamente de acordo com a sua morfologia.

É aconselhável proceder também à identificação e contagem das colónias de bolores dentro de cada género.

## 10 Expressão dos resultados

### 10.1 Caso geral

Sendo:

$n$  a soma do número de colónias de bolores contadas nas placas da suspensão-mãe ou da diluição considerada;

$n'$  a soma do número de colónias de leveduras contadas nas placas da suspensão-mãe ou da diluição considerada;

$n_1, n_2, n_3, \dots$  as somas do número de colónias de cada género, espécie ou grupo de bolor, quando identificado, que prefazem na totalidade a soma  $n$ ;

$d$  o factor da diluição em relação à qual se efectuou a contagem,

O número de colónias de bolores e leveduras por mililitro (produto líquido) ou por grama (outro produto) é:

$$(n + n') \times d$$

o número de colónias de bolores por grama ou mililitro do produto é:

$$n \times d$$

o número de colónias de leveduras por grama ou mililitro do produto é:

$$n' \times d$$

o número de colónias de cada género, espécie ou grupo de bolor, quando identificados, por grama ou mililitro presentes na amostra é respectivamente:

$$n_1 \times d$$

$$n_2 \times d$$

$$n_3 \times d$$

Arredondar os resultados obtidos a dois algarismos significativos.

Para isso, se o último algarismo for inferior a 5, o algarismo precedente não é modificado; se o último algarismo for igual ou superior a 5, o algarismo precedente é aumentado de uma unidade. Proceder deste modo até obter 2 algarismos significativos.

Referir como resultado o número de colónias de bolores e/ou leveduras por mililitro (produtos líquidos) ou por grama (outros produtos), expresso por um número compreendido entre 1,0 e 9,9 multiplicado pela potência apropriada de 10.

prNP 3277-2  
2002

p. 8 de 8

---

### 10.2 Cálculo de pequenos números

Se as placas semeadas a partir da amostra (produtos líquidos) ou da suspensão-mãe (outros produtos) não contiverem nenhuma colónia de bolor e/ou levedura, apresentar os resultados da seguinte forma:

Produtos líquidos - inferior a 1 colónia por mililitro.

Outros produtos - inferior a 1 x 1/d colónias por grama, em que

d é o factor de diluição da suspensão-mãe

### 11 Relatório de ensaio

O relatório de ensaio deve indicar o método utilizado, e os resultados obtidos. Para além disso, deve referir todos os pormenores da técnica não especificados na presente Norma, assim como eventuais factores susceptíveis de influenciarem os resultados.

O relatório de ensaio deve conter todas as informações necessárias para a identificação da amostra.

### 12 Bibliografia

NP 1934 (1986) - Microbiologia alimentar. Leite e produtos lácteos. Contagem de bolores e leveduras.

ISO 6611 (1992) - Lait et produits laitiers - Denombrement des unités formant colonies de levures et/ou moisissures - Comptage des colonies à 25 °C

ISO 13681 (1994) - Viandes et produits à base de viande - Dénombrement des levures et moisissures - Technique par comptage des colonies à 25 °C (Méthode de référence)

Donsch, K. H.; Gams, W. and Anderson, T.-H. (1980) - Compendium of Soil Fungi - Academic Press -London.

## Anexo C – European Standart FprEN 15792.

EUROPEAN STANDARD  
NORME EUROPÉENNE  
EUROPÄISCHE NORM

FINAL DRAFT  
FprEN 15792

April 2009

ICS 65.120

limite de detection - 5 µg  
factor - 2,25

English Version

### Animal feeding stuffs - Determination of zearalenone in animal feed - High performance liquid chromatographic method with fluorescence detection and immunoaffinity column clean-up

Aliments des animaux - Dosage de la zéaralénone dans les aliments des animaux - Méthode de chromatographie liquide haute performance avec détection par fluorescence et purification sur colonne d'immuno-affinité

Futtermittel - Bestimmung von Zearalenon in Futtermitteln - Hochleistungsflüssigchromatographisches Verfahren mit Fluoreszenznachweis und Reinigung an einer Immunoaffinitätsäule

This draft European Standard is submitted to CEN members for formal vote. It has been drawn up by the Technical Committee CEN/TC 327.

If this draft becomes a European Standard, CEN members are bound to comply with the CEN/CENELEC Internal Regulations which stipulate the conditions for giving this European Standard the status of a national standard without any alteration.

This draft European Standard was established by CEN in three official versions (English, French, German). A version in any other language made by translation under the responsibility of a CEN member into its own language and notified to the CEN Management Centre has the same status as the official versions.

CEN members are the national standards bodies of Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, Switzerland and United Kingdom.

**Warning :** This document is not a European Standard. It is distributed for review and comments. It is subject to change without notice and shall not be referred to as a European Standard.



EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION  
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION  
EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG

Management Centre: Avenue Marnix 17, B-1000 Brussels

© 2009 CEN All rights of exploitation in any form and by any means reserved worldwide for CEN national Members.

Ref. No. FprEN 15792:2009: E

## Contents

Page

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| Foreword .....                            | 3  |
| 1 Scope .....                             | 4  |
| 2 Normative reference(s) .....            | 4  |
| 3 Principle.....                          | 4  |
| 4 Reagents.....                           | 4  |
| 5 Apparatus .....                         | 7  |
| 6 Procedures .....                        | 8  |
| 7 HPLC determination .....                | 10 |
| 8 Calculations .....                      | 10 |
| 9 Precision.....                          | 11 |
| 10 Test report .....                      | 12 |
| Annex A (informative) Precision data..... | 13 |
| Bibliography.....                         | 15 |

## Foreword

This document (FprEN 15792:2009) has been prepared by Technical Committee CEN/TC 327 "Animal feeding stuffs", the secretariat of which is held by NEN.

This document is currently submitted to the Formal Vote.

## 1 Scope

This Standard is applicable to the determination of zearalenone in animal feed at concentrations from 30 µg/kg to 3 000 µg/kg.

## 2 Normative reference(s)

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies:

EN ISO 3696, *Water for analytical laboratory use - Specification and test methods* (ISO 3696:1987)

## 3 Principle

Zearalenone is extracted from the commodity using organic solvent. The solvent extract is then diluted with phosphate buffered saline to give an aqueous extract which is applied to an immunoaffinity column containing antibodies specific for zearalenone. The analyte is isolated, purified and concentrated on the column and removed from the antibodies with elution solvent. Zearalenone is quantitatively determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection.

## 4 Reagents

During the analysis, unless otherwise stated, use only reagents of recognised analytical grade and only distilled water or water of grade 1 as defined in EN ISO 3696. Solvents shall be of quality for HPLC analysis.

### 4.1 Acetonitrile

**WARNING** — Acetonitrile is hazardous and handling shall be carried out inside a fume cupboard. Appropriate safety equipment (lab coat, goggles, gloves) shall be worn.

### 4.2 Methanol, technical grade

**WARNING** — Methanol is hazardous and handling shall be carried out inside a fume cupboard. Appropriate safety equipment (lab coat, goggles, gloves) shall be worn. Samples shall be blended using an explosion proof blender.

### 4.3 Methanol, HPLC grade

**WARNING** — Methanol is hazardous and handling shall be carried out inside a fume cupboard. Appropriate safety equipment (lab coat, goggles, gloves) shall be worn. Samples shall be blended using an explosion proof blender.

**4.4 Sodium chloride****4.5 Disodium hydrogen orthophosphate****4.6 Potassium dihydrogen phosphate****4.7 Potassium chloride****4.8 Hydrochloric acid (32%)**

**WARNING** — Hydrochloric acid is hazardous and handling shall be carried out with the necessary precaution inside a fume cupboard. Appropriate safety equipment (lab coat, goggles, gloves) shall be worn.

**4.9 Phosphate buffered saline (PBS)**

Dissolve 8 g sodium chloride (4.4), 1,2 g disodium hydrogen orthophosphate (4.5), 0,2 g potassium dihydrogen phosphate (4.6) and 0,2 g potassium chloride (4.7) in 1 l of distilled water. Adjust the pH to 7,4 with hydrochloric acid (4.8).

**NOTE** Commercially available phosphate buffered saline tablets with equivalent properties may be used.

**4.10 Extraction solvent, methanol/water = 75+25 parts by volume**

Mix 75 parts per volume methanol (4.2) with 25 parts per volume of water

**4.11 Washing solvent, methanol/PBS = 15 + 85 parts by volume**

Mix 15 parts per volume methanol (4.3) with 85 parts per volume PBS (4.9).

**4.12 Injection solvent for HPLC analysis, methanol/water = 50+50 parts by volume**

Mix 50 parts per volume methanol (4.3) with 50 parts per volume water.

**4.13 HPLC mobile phase, methanol/water = 75+25 parts by volume**

Mix 75 parts per volume methanol (4.3) and 25 parts per volume water. Mix well and degas.

**4.14 Zearalenone, minimum purity of 98%**

**WARNING** — Zearalenone is an oestrogenic compound and shall be treated with extreme caution. Gloves and safety glasses shall be worn at all times and all standard and sample preparation stages shall be carried out in a fume cupboard.

**4.15 Zearalenone (ZON) stock solution**

10 µg Zearalenone per millilitre of Acetonitrile. *For Analysis*

May be prepared by the following: Add 4,0 ml of acetonitrile (4.1) to 5 mg of zearalenone (4.14) for a standard solution of 1,25 mg/ml. Dilute 800 µl of the 1,25 mg/ml standard solution to 5,0 ml with acetonitrile (4.1) for a standard solution of 200 µg/ml. Dilute 250 µl of the 200 µg/ml standard solution to 5,0 ml of acetonitrile (4.1) to create the stock solution of 10 µg/ml.

To determine the exact concentration record the absorption curve of this 10 µg/ml stock solution with the spectrophotometer (5.26) in the range of 200 nm to 300 nm in a 1 cm quartz cell with acetonitrile (4.1) as reference. Determine the absorption of the second maximum at  $\lambda = 274$  nm. Calculate the mass concentration of zearalenone,  $\rho_{ZON}$ , in micrograms per millilitre using equation 1:

$$\rho_{ZON} = \frac{A_{max} \times M \times 100}{\kappa \times d} \quad (1)$$

where:

$A_{max}$  is the absorption determined at the second maximum of the absorption curve (here: at 274 nm)

$M$  is the molar mass of zearalenone ( $M = 318,4$  g/mol);

$\kappa$  is the molar absorption coefficient of zearalenone in acetonitrile (4.1) (here:  $1\,262\text{ m}^2/\text{mol} \pm 1\text{ m}^2/\text{mol}$  [1]);

$d$  is the optical path length of the quartz cell in centimetres (here: 1 cm).

Store standard solutions at below  $-18^\circ\text{C}$ .

#### 4.16 ZON spiking solution

The calibrated stock solution, see (4.15). This solution is stable for 2 months if stored at below  $-18^\circ\text{C}$ .

#### 4.17 ZON working solution

Transfer an aliquot of the calibrated stock solution (4.15), equivalent to 10 µg of ZON, into a volumetric flask (5.11). Add acetonitrile (4.1) to make the total volume up to 5 ml. This is a 2 µg/ml working solution. This solution is stable for 2 months if stored at below  $-18^\circ\text{C}$ .

#### 4.18 ZON Calibration solutions for HPLC

Prepare 5 HPLC calibration solutions in separate 10 ml volumetric flasks (5.11) by pipetting the volumes shown in Table 1 below. Make up each standard to volume (10 ml) with injection solvent for HPLC (4.12).

Table 1 — Preparation of calibration solutions

| Calibration solution | Volume of ZON working solution (4.17)<br>µl | Mass concentration of calibration solution<br>= ng/ml = |
|----------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 1                    | 50 (0,1 µg)                                 | 10                                                      |
| 2                    | 250 (0,5 µg)                                | 50                                                      |
| 3                    | 450 (0,9 µg)                                | 90                                                      |
| 4                    | 650 (1,3 µg)                                | 130                                                     |
| 5                    | 850 (1,7 µg)                                | 170                                                     |

The procedures above for standard preparation can be performed either by the use of pipettes or calibrated glassware as available.

#### 4.19 Immunoaffinity column

The immunoaffinity (IA) column contains antibodies raised against zearalenone. The column shall have a capacity of not less than 1 500 ng of zearalenone and a recovery of not less than 70% when 75 ng of zearalenone are applied in 10 ml of washing solvent (4.11).

### 5 Apparatus

Usual laboratory equipment and in particular the following:

- 5.1 Analytical balance, with  $d=0,001\text{g}$  or better
- 5.2 Horizontal or vertical shaker
- 5.3 Homogeniser/ High Speed Blender
- 5.4 Vortex Mixer, or equivalent
- 5.5 pH meter
- 5.6 Mill (various screens)
- 5.7 Tumble mixer
- 5.8 Glass vials, various sizes
- 5.9 Graduated pipettes, with volumes of 5 ml and 50 ml
- 5.10 Graduated cylinders with and without stoppers, with volumes of 5 ml and 250 ml
- 5.11 Volumetric flasks, with volumes of 3 ml, 5 ml and 10 ml
- 5.12 Beaker, 250 ml
- 5.13 Conical or screw cap flasks, with volumes of 100 ml and 250 ml to 500 ml
- 5.14 Glass funnels, of appropriate size
- 5.15 Folded filters, cellulose (ca.  $30\text{ }\mu\text{m}$  pore size) for the glass funnels (5.14)
- 5.16 Filter disks, binder-free glass microfibre ( $< 2\text{ }\mu\text{m}$  pore size) of appropriate size for the solvent vacuum filtration system (5.22)
- 5.17 Pipettors or gas-tight glass syringes, with a volume of 100  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$  and 1 000  $\mu\text{l}$

**5.18 Vacuum manifold or Automated SPE Vacuum System**, capable of accommodating the immunoaffinity columns

**5.19 Reservoirs**, of appropriate volume with attachments to fit the immunoaffinity columns

**5.20 Plastic syringes**, 5 ml

**5.21 Vacuum pump**, capable of generating sufficient vacuum for the solvent vacuum filtration system (5.22)

**5.22 Solvent vacuum filtration system**, fitted with glass microfibre filter (5.16)

**5.23 HPLC syringe filter unit**, polyamide (nylon) with 0,45 µm pore size

**5.24 Ultrasonic bath**

**5.25 HPLC apparatus**, comprising the following:

**5.25.1 Injection system**, manual or autosampler, with loop suitable for 100 µl to 300 µl injections

**5.25.2 Pump**, isocratic, pulsation-free, capable of maintaining a volume flow rate of 0,5 ml/min to 1,5 ml/min

**5.25.3 Analytical reversed phase HPLC column**,  
Generally every RP-column is suitable that allows a sufficient separation of zearalenone from other interfering components. For example Phenomenex ODS3-Prodigy (150 mm x 4,6 mm i.d.), 5 µm particle size, 250 Å pore size, or Spherisorb ODS2-Excel (250 mm x 4,6 mm i.d.), 5 µm particle size, 250 Å pore size have been found to be suitable.

**5.25.4 Pre-column (optional)**, appropriate for the analytical column used

**5.25.5 Fluorescence detector**, fitted with a flow cell and suitable for measurements with excitation wavelength of 274 nm, and emission of 446 nm

**5.25.6 Data system**, integrator or PC workstation

**5.26 UV spectrophotometer**, for checking the concentration of the stock solution (4.15)

## **6 Procedures**

### **6.1 Sample preparation**

It is important that the laboratory receives a sample which is truly representative and has not been damaged or changed during transport or storage. Samples should be taken and prepared in accordance with European legislation where applicable [2]. Samples should be finely ground and thoroughly mixed using a mill (5.6) and a tumble mixer (5.7) or another process that has been demonstrated to give complete homogenisation before a test portion is removed for analysis.

In all instances if the sample has been frozen allow it to thaw completely before sampling. Stir the sample thoroughly before removing an analytical test portion.

## 6.2 Extraction

Weigh 20,00 g (recorded to 2 decimal places) test portion into a screw cap flask of 250 ml to 500 ml (5.13). Add 150 ml extraction solvent (4.10). Mix briefly by hand to obtain a homogeneous suspension then either shake for 1 hour on a shaker (5.2), or sonicate for 15 minutes in an ultrasonic bath (5.24) and shake on a shaker (5.2) for another 15 minutes.

Filtrate extract through folded filter paper (5.15) and collect the extract in a screw cap flask of 100 ml (5.13). Transfer exactly 30 ml (or 3 ml in case of results above 500 µg/kg, see section 8) of the filtered extract into a 250 ml graduated cylinder with stopper (5.10). Dilute the extract in the cylinder with PBS (4.9) to the 150 ml mark. Mix and filtrate approximately 20 ml of this diluted extract through a glass microfiber filter (5.16) into a glass beaker by applying a slight vacuum (5.22). Do not apply too strong a vacuum in the beginning of the filtration process, as this can lead to turbid filtered extracts after filtration. Discard these 20 ml and filtrate another approximately 70 ml for analysis.

Proceed immediately with the immunoaffinity column cleanup procedure (6.3).

## 6.3 Immunoaffinity Clean-up

Connect the immunoaffinity column (4.19) to the vacuum manifold (5.18) and attach a reservoir (5.19) to the top of the immunoaffinity column. Precondition the immunoaffinity column (4.19) with 20 ml of PBS (4.9) using a flow rate of 3 ml/minute to 5 ml/minute. Pipette 50 ml of the filtered and diluted sample extract (6.2) into the reservoir. Let the extract pass through the column by gravity at a steady flow rate until all the extract has passed and the last solvent portion reaches the frit of the column. The flow rate should be 1 drop/second to 2 drops/second.

After the extract has passed through the column wash the column with 5 ml of washing solvent (4.11) followed by 15 ml of water at a rate of 1 drop/second to 2 drops/second.

Remove residual water from the column (4.19) by passing 3 ml of air or nitrogen through the column (1 second to 2 seconds). Discard all the eluates from this stage of the clean-up procedure.

## 6.4 Preparation of the test solution

Place a 5 ml graduated cylinder (5.10) or a 3 ml volumetric flask (5.11) under the column and pass 0,75 ml of methanol (4.3) through the column, collecting the eluate. After the last drops of methanol have passed through the column allow the methanol to remain on the column for approximately 1 minute. Then add another 0,75 ml of methanol (4.3) and continue to collect the eluate. Carefully pass air through the column in order to collect any residual methanol.

Fill the graduated cylinder/volumetric flask to the 3 ml mark with water and mix. After mixing check volume again and adjust if necessary. In case of turbid samples filtrate the test solution through a HPLC syringe filter unit (5.23) with a plastic syringe (5.20) before injection.

**NOTE** Alternatively to the manual procedure (6.4) the immunoaffinity clean-up and elution may be performed with an automatic sample preparation unit, provided that volumes and flow rates remain unchanged.

## 6.5 Spiking procedure

To determine the recovery spike a zearalenone-free representative material with the ZON spiking solution (4.16). The spiking level should be within the calibration range (preferably mid-range). Leave the spiked sample to stand for a minimum of 30 minutes to ensure evaporation of the solvent.

## 7 HPLC determination

### 7.1 Calibration graph

Prepare a calibration graph at the beginning of every day of analyses using the ZON calibration solutions (4.18). Establish the calibration curve prior to the analyses of test samples by plotting the concentration of ZON [ng/ml] (x-axis) against the peak signal as area or height (y-axis), determine slope and possible intercept with linear regression, and check for linearity using appropriate diagnostics.

### 7.2 Determination of zearalenone in test solutions

Inject aliquots of the test solutions (6.4) into the chromatograph using the same conditions used for the preparation of the calibration graph.

### 7.3 Peak identification

Identify the zearalenone peak in the test solution by comparing the retention time with that of the nearest HPLC calibration solution (4.18) injected during the HPLC analyses batch. The concentration of zearalenone in the test solution must fall within the calibration range. If the zearalenone level in the solution exceeds the concentration of the highest calibration solution the test solution shall be diluted with HPLC diluent to bring it within calibration range and be reanalysed. The dilution factor must be incorporated into all subsequent calculations.

### 7.4 HPLC operating conditions

When the column specified in 5.25.3 and the mobile phase specified in 4.13 were used, the following settings were found to be appropriate.

Flow rate mobile phase (column): 0,7 ml/min to 1,0 ml/min;

Fluorescence detection, emission wavelength: 446 nm to 450 nm;

Fluorescence detection, excitation wavelength: 274 nm to 275 nm;

Injection volume: 100 µl to 300 µl

## 8 Calculations

Determine from the calibration graph the mass concentration in ng/ml of the zearalenone in the aliquot of test solution injected onto the HPLC column.

Calculate the mass fraction of zearalenone,  $w_{ZON}$ , in nanograms per gram or micrograms per kilogram to one decimal place using the equation below:

$$w_{ZON} = c_{ZON} \times \frac{V_5}{V_4} \times \frac{V_3}{V_2} \times \frac{V_1}{m_s} \quad (2)$$

where

$c_{ZON}$  is the mass concentration of Zearalenone as determined from calibration (7.1);

$V_5$  is the volume of the test solution (3,0 ml; 6.4);

$V_4$  is the volume of the aliquot of diluted filtered extract applied to the immunoaffinity column (50 ml; 6.3);

- $V_3$  is the total volume of the diluted filtered extract (150 ml; 6.2);  
 $V_2$  is the volume of the aliquot of extract used for dilution (30 ml or 3 ml; 6.2);  
 $V_1$  is the total volume of the extraction solvent (150 ml; 6.2);  
 $m_s$  is the mass of the extracted sample ( $m_s = 20$  g);

The above equation can be simplified if the described masses and volumes have been used:

$$w_{ZON} = c_{ZON} \times 2,25 \quad (30 \text{ ml of extract were diluted}) \quad (3)$$

Should the above calculation render a value above 500 then a new dilution of 3 ml of the sample extract should be prepared (see section 6.2). The simplified equation is then as follows:

$$w_{ZON} = c_{ZON} \times 22,5 \quad (3 \text{ ml of extract were diluted}) \quad (4)$$

## 9 Precision

### 9.1 Interlaboratory study

Details of an interlaboratory study on the precision of the method are given in [3]. The values derived from this interlaboratory study may not be applicable to concentration ranges and/or matrices other than those shown.

### 9.2 Repeatability

The absolute difference between two single test results found on identical test materials by one operator using the same apparatus within the shortest feasible time interval will exceed the repeatability limit  $r$  in not more than 5% of the cases.

The values are:

|                                          |                                                             |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| $\bar{x} = 31,5 \text{ } \mu\text{g/kg}$ | $r = 5,0 \text{ } \mu\text{g/kg}$ (naturally contaminated)  |
| $\bar{x} = 69,7 \text{ } \mu\text{g/kg}$ | $r = 13,8 \text{ } \mu\text{g/kg}$ (naturally contaminated) |
| $\bar{x} = 307 \text{ } \mu\text{g/kg}$  | $r = 81,7 \text{ } \mu\text{g/kg}$ (naturally contaminated) |
| $\bar{x} = 87,4 \text{ } \mu\text{g/kg}$ | $r = 19,1 \text{ } \mu\text{g/kg}$ (fortified)              |
| $\bar{x} = 126 \text{ } \mu\text{g/kg}$  | $r = 29,8 \text{ } \mu\text{g/kg}$ (fortified)              |

### 9.3 Reproducibility

The absolute difference between two single test results on identical test materials reported by two laboratories will exceed the reproducibility limit  $R$  in not more than 5% of the cases.

The values are:

|                                          |                                                             |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| $\bar{x} = 31,5 \text{ } \mu\text{g/kg}$ | $R = 15,2 \text{ } \mu\text{g/kg}$ (naturally contaminated) |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|

$\bar{x} = 69,7 \text{ } \mu\text{g/kg}$        $R = 31,8 \text{ } \mu\text{g/kg}$  (naturally contaminated)

$\bar{x} = 307 \text{ } \mu\text{g/kg}$        $R = 133 \text{ } \mu\text{g/kg}$  (naturally contaminated)

$\bar{x} = 87,4 \text{ } \mu\text{g/kg}$        $R = 52,5 \text{ } \mu\text{g/kg}$  (fortified)

$\bar{x} = 126 \text{ } \mu\text{g/kg}$        $R = 62,6 \text{ } \mu\text{g/kg}$  (fortified)

## 10 Test report

The test report shall contain the following data:

- a) information necessary for the identification of the sample (kind of sample, origin of sample, designation);
- b) a reference to this European Standard;
- c) the date and type of sampling procedure (if known);
- d) the date of receipt;
- e) the date of test;
- f) the test results and the units in which they have been expressed;
- g) whether the repeatability has been verified;
- h) particular points observed in the course of the test;
- i) operations not specified in the method or regarded as optional, which might have effected the results.

## Annex A

(informative)

### Precision data

The following data were obtained in interlaboratory studies [3] according to AOAC Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis [4].

Table A.1 — Precision data

| Sample                                                     | Animal feed |       |                   |      |      |      |
|------------------------------------------------------------|-------------|-------|-------------------|------|------|------|
|                                                            | 2005        | 2005  | 2005              | 2005 | 2005 | 2005 |
| Year of inter-laboratory study                             | 2005        | 2005  | 2005              | 2005 | 2005 | 2005 |
| Number of laboratories                                     | 14          | 15    | 15                | 15   | 15   | 15   |
| Number of laboratories retained after eliminating outliers | 14          | 15    | 15                | 12   | 14   | 15   |
| Number of outliers (laboratories)                          | 0           | 0     | 0                 | 3    | 1    | 0    |
| Number of accepted results                                 | 14          | 15    | 15                | 12   | 14   | 15   |
| Mean value $\bar{x}$ , µg/kg                               | 87,4        | 126,0 | <20               | 31,5 | 69,7 | 307  |
| Repeatability standard deviation $s_r$ , µg/kg             | 6,8         | 10,7  | n.a. <sup>a</sup> | 1,8  | 5,0  | 29,2 |
| Coefficient of variation of repeatability CV( $r$ ), %     | 7,8         | 8,5   | n.a. <sup>a</sup> | 5,7  | 7,1  | 9,5  |
| Repeatability limit $r$ , µg/kg <sup>b</sup>               | 19,1        | 29,8  | n.a. <sup>a</sup> | 5,0  | 13,8 | 81,7 |
| Reproducibility standard deviation $s_R$ , µg/kg           | 18,7        | 22,4  | n.a. <sup>a</sup> | 5,5  | 11,4 | 47,5 |
| Coefficient of variation of reproducibility CV( $R$ ), %   | 21,4        | 17,7  | n.a. <sup>a</sup> | 17,3 | 16,3 | 15,5 |
| HorRat value                                               | 0.9         | 0.8   | n.a. <sup>a</sup> | 0.6  | 0.7  | 0.8  |
| Reproducibility limit $R$ , µg/kg <sup>c</sup>             | 52,5        | 62,6  | n.a. <sup>a</sup> | 15,2 | 31,8 | 133  |
| Recovery, %                                                | 75          | 72    | n.a. <sup>a</sup> | n.a. | n.a. | n.a. |
| a - n.a.: not applicable                                   |             |       |                   |      |      |      |
| b - $r = 2,8 \times s_r$                                   |             |       |                   |      |      |      |
| c - $R = 2,8 \times s_R$                                   |             |       |                   |      |      |      |

Table A.2 – Material composition

| Test Material | Ingredient            | Amount (kg) | Composition <sup>1</sup>                                                              |
|---------------|-----------------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Blank         | Compound pig feed     | 4,4         | peas, soy, wheat, barley, tapioca, cabbage seeds, animal fat, corn, calcium carbonate |
|               | Compound rabbit feed  | 2,2         | wheat, alfalfa, sunflower seeds, cabbage seeds, straw molasses, barley, roasted soy   |
|               | Compound horse feed   | 2,2         | Barley flakes, oat, cornflakes, oil, alfalfa, pellets of grass fibres                 |
|               | Compound chicken feed | 2,2         | barley, wheat, oat, several cereals, oil corn                                         |
|               | Alfalfa               | 1,0         | alfalfa                                                                               |
| Level 1       | Compound pig feed     | 3,0         | peas, soy, wheat, barley, tapioca, cabbage seeds, animal fat, corn, calcium carbonate |
|               | Corn                  | 2,6         | corn, blank                                                                           |
|               | Compound rabbit feed  | 1,5         | wheat, alfalfa, sunflower seeds, cabbage seeds, straw molasses, barley, roasted soy   |
|               | Corn                  | 0,6         | corn, contaminated                                                                    |
|               | Wheat                 | 0,2         | wheat, contaminated                                                                   |
| Level 2       | Corn                  | 2,5         | corn, blank                                                                           |
|               | Compound pig feed     | 1,5         | peas, soy, wheat, barley, tapioca, cabbage seeds, animal fat, corn, calcium carbonate |
|               | Compound rabbit feed  | 1,5         | wheat, alfalfa, sunflower seeds, cabbage seeds, straw molasses, barley, roasted soy   |
|               | Compound horse muesli | 0,5         | oat, barley flakes, cornflakes, peas, molasses, plant oil                             |
|               | Compound dog feed     | 0,5         | meat 14%, cereals 14%, sugar, oil, minerals, carrots 4%                               |
|               | Alfalfa               | 0,5         | Alfalfa (luzerne)                                                                     |
|               | Corn                  | 0,5         | corn, contaminated                                                                    |
| Level 3       | Level 2               | 2           | (see "Level 2")                                                                       |
|               | Compound pig feed     | 2           | peas, soy, wheat, barley, tapioca, cabbage seeds, animal fat, corn, calcium carbonate |

<sup>1</sup> In decreasing amounts.

## Bibliography

- 
- [1] Krska R., Welzig E., Josephs R. D. et al., 2003. Purity Assessment of Crystalline Zearalenone. J. AOAC Int, 2003. **86**(4), 722-728
  - [2] Commission Regulation EC (No) 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs
  - [3] Arranz I., Mischke C., Stroka J., et al., *Liquid Chromatographic Method for the Quantification of Zearalenone in Baby Food and Animal Feed: Interlaboratory Study*. J AOAC Int, 2007. **90**(6): 1598-1609
  - [4] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, p. 23-51

## Anexo D – European Standart FprEN 15791.

19 de Maio 2009

EUROPEAN STANDARD  
NORME EUROPÉENNE  
EUROPÄISCHE NORM

Food Feed  
NORMA Actual

**FINAL DRAFT**  
**FprEN 15791**

April 2009

ICS 65.120

English Version

### Foodstuffs - Determination of Deoxynivalenol in animal feed - HPLC method with immunoaffinity column clean-up

Produits alimentaires - Dosage du déoxynivalénol dans les  
aliments pour animaux - Méthode de chromatographie  
liquide haute performance avec détection UV et purification  
sur colonne d'immuno-affinité

Futtermittel - Bestimmung von Deoxynivalenol in  
Futtermitteln - HPLC-Verfahren mit Reinigung an einer  
Immunoaffinitätssäule

This draft European Standard is submitted to CEN members for formal vote. It has been drawn up by the Technical Committee CEN/TC 327.

If this draft becomes a European Standard, CEN members are bound to comply with the CEN/CENELEC Internal Regulations which stipulate the conditions for giving this European Standard the status of a national standard without any alteration.

This draft European Standard was established by CEN in three official versions (English, French, German). A version in any other language made by translation under the responsibility of a CEN member into its own language and notified to the CEN Management Centre has the same status as the official versions.

CEN members are the national standards bodies of Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, Switzerland and United Kingdom.

**Warning:** This document is not a European Standard. It is distributed for review and comments. It is subject to change without notice and shall not be referred to as a European Standard.

• S / Formo

• Tempo de retenção 19,30

• Tempo final - 15 min

• Fortificação mais de  
tempo 1h



EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION  
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION  
EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG

Management Centre: Avenue Marnix 17, B-1000 Brussels

© 2009 CEN All rights of exploitation in any form and by any means reserved  
worldwide for CEN national Members.

Ref. No. FprEN 15791:2009: E

## Contents

Page

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| Foreword .....                             | 3  |
| 1 Scope .....                              | 4  |
| 2 Normative reference(s) .....             | 4  |
| 3 Principle .....                          | 4  |
| 4 Reagents .....                           | 4  |
| 5 Apparatus .....                          | 6  |
| 6 Procedure .....                          | 7  |
| 7 HPLC determination .....                 | 8  |
| 8 Calculation .....                        | 9  |
| 9 Precision .....                          | 10 |
| 10 Test report .....                       | 10 |
| Annex A (informative) Precision data ..... | 12 |
| Annex B (informative) Chromatogram .....   | 14 |
| Bibliography .....                         | 15 |

## Foreword

This document (FprEN 15791:2009) has been prepared by Technical Committee CEN/TC 327 "Animal feeding stuffs", the secretariat of which is held by NEN.

This document is currently submitted to the Formal Vote.

**WARNING — The use of this standard can involve hazardous materials, operations and equipment. This standard does not purport to address all the safety problems associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.**

## 1 Scope

This Standard is applicable to the determination of deoxynivalenol (DON) in animal compound feed at concentrations of 150 µg/kg up to at least 4 000 µg/kg.

## 2 Normative reference(s)

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies:

EN ISO 3696, *Water for analytical laboratory use - Specification and test methods* (ISO 3696:1987)

## 3 Principle

Deoxynivalenol (DON) is extracted from the commodity using water. The aqueous extract is then cleaned up with an immunoaffinity column to remove impurities from the sample. Subsequently DON is quantitatively determined by HPLC with UV detection.

## 4 Reagents

During the analysis, unless otherwise stated, use only reagents of recognised analytical grade and only double-distilled water or water of grade 1 as defined in EN ISO 3696. Solvents shall be of quality for HPLC analysis.

### 4.1 Acetonitrile

**WARNING** — Acetonitrile is hazardous and handling shall be carried out inside a fume cupboard. Appropriate safety equipment (lab coat, goggles, gloves) shall be worn.

### 4.2 Deoxynivalenol (DON), with a minimum purity of 97%

**WARNING** — Deoxynivalenol is highly toxic. Gloves and safety glasses shall be worn at all times and all standard and sample preparation stages shall be carried out in a fume cupboard.

### 4.3 Methanol

**WARNING** — Methanol is hazardous and handling shall be carried out inside a fume cupboard. Appropriate safety equipment (lab coat, goggles, gloves) shall be worn.

### 4.4 Glacial acetic acid

**WARNING** — Glacial acetic acid is hazardous and handling shall be carried out inside a fume cupboard. Appropriate safety equipment (lab coat, goggles, gloves) shall be worn.

### 4.5 Mobile Phase

Mix 15 parts per volume of methanol (4.3) with 84,9 parts per volume of water and 0,1 parts of glacial acetic acid (4.4). The exact amount of methanol used and whether acetic acid will have to be used depends on the HPLC column chosen for analysis and must be adjusted if necessary. Degas this solution before use.

#### 4.6 Wash Solvent

Mix 50 parts per volume of methanol (4.3) with 50 parts per volume of water.

#### 4.7 DON stock solution

250 µg Deoxynivalenol per ml of Acetonitrile.

May be prepared by the following: Add 4,0 ml of acetonitrile (4.1) to 5 mg of DON (4.2) for a solution of 1,25 mg/ml. Dilute 1 000 µl of the 1,25 mg/ml solution to 5,0 ml with acetonitrile for the stock solution of 250 µg/ml. Dilute 200 µl of the 250 µg/ml stock solution in a 2,0 ml volumetric flask (5.11) with acetonitrile to create a diluted stock solution of 25 µg/ml.

To determine the exact concentration record the absorption curve of this 25 µg/ml diluted stock solution with the spectrophotometer (5.15) in the range of 200 nm to 270 nm in a 1 cm quartz cell with acetonitrile (4.1) as reference. Determine the absorption at 220 nm. Calculate the mass concentration of deoxynivalenol,  $\rho_{DON}$ , in micrograms per millilitre using equation 1:

$$\rho_{DON} (\sim 25 \mu\text{g} / \text{ml}) = \frac{A_{\max} \times M \times 100}{\kappa \times d} \quad (1)$$

where:

$A_{\max}$  is the absorption determined at the maximum of the absorption curve (here: at 220 nm);

$M$  is the molar mass of deoxynivalenol ( $M = 296,3 \text{ g/mol}$ );

$\kappa$  is the molar absorption coefficient of deoxynivalenol in acetonitrile (4.1), (here:  $681 \text{ m}^2/\text{mol} \pm 12,6 \text{ m}^2/\text{mol} [1]$ );

$d$  is the optical path length of the quartz cell in centimetres (here: 1 cm).

Calculate the exact concentration of the 250 µg/ml stock solution by the following equation:

$$\rho_{DON} (\sim 250 \mu\text{g} / \text{ml}) = \rho_{DON} (\sim 25 \mu\text{g} / \text{ml}) \times 10 \quad (2)$$

Stock solution may be stored in the dark for up to 3 months at 4°C to 8°C or at least 6 months at below -18 °C.

NOTE Stock solution preparation can be carried out gravimetrically by accurately weighing the DON standard material and the solvent used to dissolve it.

#### 4.8 DON spiking solution

Pipette an aliquot of the calibrated DON stock solution (4.7), equivalent to 500 µg DON, into a 5 ml volumetric flask (5.11). Make up to the mark with acetonitrile (4.1). This will result in the spiking solution of 100 µg/ml.

#### 4.9 DON working solution

Pipette an aliquot of the calibrated diluted DON stock solution (4.7), equivalent to 50 µg DON, into a 5 ml volumetric flask (5.11). Make up to the mark with acetonitrile (4.1). This will result in the DON working solution of 10 µg/ml.

#### 4.10 DON Calibration solutions

Calibration solutions are prepared from the 10 µg/ml DON working solution (4.9). For example, add the volumes of 10 µg/ml DON working solution (4.9) shown in the table below into 10 ml volumetric flasks (5.11). Fill the flasks up to the mark with mobile phase (4.5). Deviations are permissible as long as the lowest level is above the limit of detection, the highest level does not lead to saturation of the detector signal, and there are at least two more levels equidistantly in between.

Table 1 — Preparation of standard solutions

| Calibration solution | DON Working solution (4.9)<br>(µl) | DON concentration<br>ng/ml |
|----------------------|------------------------------------|----------------------------|
| 1.                   | 450                                | 450                        |
| 2                    | 375                                | 375                        |
| 3                    | 300                                | 300                        |
| 4                    | 225                                | 225                        |
| 5                    | 150                                | 150                        |
| 6                    | 75                                 | 75                         |

#### 4.11 DON immunoaffinity clean-up columns

The immunoaffinity (IA) column contains antibodies raised against deoxynivalenol. The column shall have a capacity of not less than 2 500 ng of DON and shall give a recovery of not less than 70% when 25 ng of DON are applied in 1 ml to 2 ml of water (depending on manufacturer's instructions).

### 5 Apparatus

Usual laboratory equipment and in particular the following:

- 5.1 **Analytical balance**, with  $d=0,001\text{g}$  for sample weighing, with  $d=0,01\text{mg}$  for gravimetric preparation of the DON stock solution (4.7)
- 5.2 **Homogeniser/ High Speed Blender**
- 5.3 **Laboratory shaker**
- 5.4 **Vortex Mixer**, or equivalent
- 5.5 **Mill (various screens)**
- 5.6 **Tumble mixer**
- 5.7 **Screw cap flasks**, with volumes of 250 ml and 500 ml
- 5.8 **Funnels**, of appropriate size
- X 5.9 **Filter**, cellulose with ca. 30 µm pore size (100 µm)

**5.10 Filter**, binder-free glass microfiber with ca. 2 µm pore size

**5.11 Volumetric flasks**, with volumes of 2 ml, 5 ml, and 10 ml

**5.12 Graduated pipettes**, with volumes of 1 ml and 5 ml

**5.13 Adjustable Pipettors or gas-tight glass syringes**, with volumes of 100 µl and 1 000 µl

**5.14 HPLC system consisting of:**

**5.14.1 Pump**, capable at least of generating binary gradients, pulsation-free, at flows appropriate for the analytical column

**5.14.2 Analytical column**

Any column which allows for sufficient separation of deoxynivalenol from other interfering components is suitable. Examples are: Phenomenex ODS3-Prodigy (15 cm x 4,6 mm i.d.), 5 µm particle size, 100 Å pore size, Octadecylsilane (ODS) 250 mm x 4,6 mm i.d., 3 µm particle size, 80 Å pore size, Octadecyl (C18) 250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm particle size, 180 Å pore size

**5.14.3 Pre-column (optional)**, appropriate for the analytical column used

**5.14.4 Autosampler**, capable of injecting appropriate volumes with sufficient repeatability

**5.14.5 UV detector**, capable of measuring at 220 nm

**5.14.6 Data collection system**

**5.15 UV spectrophotometer**, for checking the concentration of the DON stock solution (4.7)

**5.16 Reservoirs**, of appropriate size with adaptors to fit the immunoaffinity columns

**5.17 Glass vials**, of appropriate size for autosampler (5.14.4) but with minimum volume of 2,0 ml

**5.18 Syringe filter unit**, polyamide (nylon) with 0,45 µm pore size

**5.19 Evaporator**, capable of maintaining 50°C with a steady stream of air or nitrogen

## 6 Procedure

### 6.1 Sample preparation

It is important that the laboratory receives a sample which is truly representative and has not been damaged or changed during transport or storage. Samples should be taken and prepared in accordance with European legislation where applicable [2]. Samples should be finely ground and thoroughly mixed using a mill (5.5) and a tumble mixer (5.6) or another process that has been demonstrated to give complete homogenisation before a test portion is removed for analysis.

In all instances if the sample has been frozen allow it to thaw completely before sampling. Mix the sample thoroughly before removing an analytical test portion.

## 6.2 Extraction

Weigh a 25,0 g test portion into a 250 ml or 500 ml screw cap flask (5.7). Add 200 ml of deionised water, cap and shake for 1 hour with a shaker (5.3).

Prepare a funnel (5.8) with filter paper (5.9). Filtrate the extracted sample into a clean 250 ml or 500 ml screw cap flask (5.7).

## 6.3 Immunoaffinity Column Clean-up

Attach a reservoir (5.16) to an immunoaffinity column. Add 8 ml of deionised water. Then transfer 2,0 ml of the filtered extract (see above; 0,5 ml in case of analytical results above 4 000 µg/kg; see section 8) into the reservoir (5.16). Allow this solution to pass slowly through the column by gravity at a rate of 1 drop/s to 2 drops/s. When the extract has passed completely through the immunoaffinity column, pass 5 ml of deionised water through the column. Remove residual liquid by passing nitrogen or air through the column for about 5 seconds. Discard all the eluates from this stage of the clean-up procedure.

Finally, place a HPLC autosampler vial (5.17) under the column and pass 0,5 ml of methanol (4.3) through the column by gravity collecting the eluate. After the last drops of methanol have passed through the column allow the methanol to remain on the column for approximately 1 minute. Then add another 1,0 ml of methanol (4.3) and continue to collect the eluate. Carefully pass nitrogen or air through the column in order to collect any residual eluate.

**NOTE** Alternatively to the manual procedure (6.4) the immunoaffinity clean-up and elution may be performed with an automatic sample preparation unit, provided that volumes and flow rates remain unchanged.

## 6.4 Preparation of the test solution for HPLC analysis

Place the vial with the eluate in the evaporator (5.19) and carefully evaporate to dryness under nitrogen or air at ca. 50°C. Immediately afterwards cool the HPLC vial to ambient temperature and reconstitute the residue with 0,50 ml of HPLC mobile phase (4.5). Mix well with vortex mixer (5.4) for at least 30 seconds to ensure the residue is completely re-dissolved. In case of turbidity filtrate the test solution through a syringe filter unit (5.18).

## 6.5 Spiking procedure

To determine the recovery spike a deoxynivalenol-free material with the spiking solutions (4.8). The spiking level should be within the calibration range (preferably mid-range). Leave the spiked sample to stand for a minimum of 30 minutes to ensure evaporation of the solvent.

# 7 HPLC determination

## 7.1 Calibration graph

Prepare a calibration graph at the beginning of every day of analyses by injecting calibration solutions (4.10) at different suitable concentrations into the chromatograph. Establish the calibration curve prior to analysis of test samples by plotting the concentration of DON [ng/ml] (x-axis) against the peak signal as area or height (y-axis), determine slope and possible intercept with linear regression, and check the plot for using appropriate diagnostics.

## 7.2 Determination of deoxynivalenol in the test solution

Inject aliquots of the test solutions into the chromatograph using the same conditions used for the preparation of the calibration graph.

### 7.3 Peak identification

Identify the deoxynivalenol peak in the test solution by comparing the retention time with that of the nearest HPLC calibration solution (4.10) injected in the HPLC analyses batch. The concentration of deoxynivalenol in the test solution must fall within the calibration range. If the deoxynivalenol level in the test solution exceeds the concentration of the highest calibration solution the test solution shall be diluted with HPLC mobile phase to bring it within calibration range and be reanalysed. The dilution factor must be incorporated into all subsequent calculations.

### 7.4 HPLC operating conditions

Using the equipment outlined in 5.14 the following conditions have shown to provide adequate separation:

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| Injection volume:                | 100 µl - 300 µl |
| UV detection wavelength:         | 220 nm          |
| Flow rate mobile phase (column): | 1,0 ml/min      |

If the HPLC pump delivered mobile phase (4.5) through channel A and wash solvent (4.6) through channel B the gradient profile would look as follows:

| Time [min] | Channel A [%] | Channel B [%] |
|------------|---------------|---------------|
| 0 to 15    | 100           | 0             |
| 15 to 25   | 0             | 100           |
| 25 to 35   | 100           | 0             |

NOTE Mobile phases prepared with acetonitrile and water have also been shown to be suitable alternatives. Such mobile phases may be used provided sufficient separation is achieved.

## 8 Calculation

Determine from the calibration graph the mass concentration in ng/ml of the deoxynivalenol in the test solution injected onto the HPLC column.

Calculate the mass fraction of deoxynivalenol,  $w_{DON}$ , in nanograms per gram or micrograms per kilogram to one decimal place using the equation below:

$$w_{DON} = c_{DON} \times \frac{V_3}{V_2} \times \frac{V_1}{m_s} \quad (3)$$

where

|           |                                                                                      |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| $c_{DON}$ | is the mass concentration of deoxynivalenol as determined through calibration (7.1); |
| $V_3$     | is the total volume of the test solution (0,5 ml; 6.4);                              |
| $V_2$     | is the volume of the aliquot of extract used for clean-up (2,0 ml or 0,5 ml; 6.3);   |
| $V_1$     | is the total volume of the extraction solvent (200 ml; 6.2);                         |
| $m_s$     | is the mass of the extracted test portion ( $m_s = 25,0$ g; 6.2);                    |

The above equation can be simplified if the described masses and volumes have been used:

$$w_{DON} = c_{DON} \times 2 \quad (2 \text{ ml of extract were cleaned-up}) \quad (4)$$

Should the above calculation render a value above 500 then a new clean-up with 0,5 ml of the sample extract should be prepared (see section 6.3). The simplified equation is then as follows:

$$w_{DON} = c_{DON} \times 8 \quad (0,5 \text{ ml of extract were cleaned-up}) \quad (5)$$

## 9 Precision

### 9.1 Interlaboratory study

Details of an interlaboratory study on the precision of the method are shown in [3]. The values derived from this interlaboratory study may not be applicable to concentration ranges and/or matrices other than those given.

### 9.2 Repeatability

The absolute difference between two single test results found on identical test materials by one operator using the same apparatus within the shortest feasible time interval will exceed the repeatability limit  $r$  in not more than 5% of the cases.

$$\bar{x} = 229 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad r = 87,5 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 401 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad r = 97,2 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 188 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad r = 31,9 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 505 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad r = 233,2 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 1\,013 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad r = 232,9 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

### 9.3 Reproducibility

The absolute difference between two single test results on identical test materials reported by two laboratories will exceed the reproducibility limit  $R$  in not more than 5% of the cases.

$$\bar{x} = 229 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad R = 100,6 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 401 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad R = 184,7 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 188 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad R = 132,8 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 505 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad R = 329,2 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 1\,013 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad R = 299,0 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

## 10 Test report

The test report shall contain the following data:

- a) information necessary for the identification of the sample (kind of sample, origin of sample, designation);
- b) a reference to this European Standard;
- c) the date and type of sampling procedure (if known);
- d) the date of receipt;
- e) the date of test;
- f) the test results and the units in which they have been expressed;
- g) whether the repeatability has been verified;
- h) particular points observed in the course of the test;
- i) operations not specified in the method or regarded as optional, which might have affected the results.

## Annex A (informative)

### Precision data

The following data were obtained in an interlaboratory study [3] according to AOAC Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis [4].

Table A.1 — Precision data

| Sample                                                                                                      | Animal feed | Animal feed | Animal feed       | Animal feed       | Animal feed       | Animal feed       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Year of inter-laboratory study                                                                              | 2005        | 2005        | 2005              | 2005              | 2005              | 2005              |
| Number of laboratories                                                                                      | 11          | 11          | 13                | 13                | 13                | 12                |
| Number of laboratories retained after eliminating outliers                                                  | 10          | 10          | 12                | 11                | 13                | 12                |
| Number of outliers (laboratories)                                                                           | 1           | 1           | 1                 | 2                 | 0                 | 0                 |
| Number of accepted results                                                                                  | 10          | 10          | 12                | 11                | 13                | 12                |
| Mean value $\bar{x}$ , µg/kg                                                                                | 229         | 401         | <30               | 188               | 505               | 1 013             |
| Repeatability standard deviation $s_r$ , µg/kg                                                              | 31,2        | 34,7        | n.a. <sup>c</sup> | 11,4              | 83,3              | 83,2              |
| Coefficient of variation of repeatability, CV(r), %                                                         | 13,7        | 8,7         | n.a. <sup>c</sup> | 6,1               | 16,5              | 8,2               |
| Repeatability limit $r^a$ , µg/l                                                                            | 87,5        | 97,2        | n.a. <sup>c</sup> | 31,9              | 233,2             | 232,9             |
| Reproducibility standard deviation $s_R$ , µg/kg                                                            | 35,9        | 66,0        | n.a. <sup>c</sup> | 47,4              | 117,6             | 106,8             |
| Coefficient of variation of reproducibility, CV(R), %                                                       | 15,7        | 16,5        | n.a. <sup>c</sup> | 25,2              | 23,3              | 10,5              |
| HorRat value                                                                                                | 0,8         | 0,9         | n.a. <sup>c</sup> | 1,2               | 1,3               | 0,7               |
| Reproducibility limit $R^b$ , µg/l                                                                          | 100,6       | 184,7       | n.a. <sup>c</sup> | 132,8             | 329,2             | 299,0             |
| Recovery, %                                                                                                 | 100         | 93          | n.a. <sup>c</sup> | n.a. <sup>c</sup> | n.a. <sup>c</sup> | n.a. <sup>c</sup> |
| <sup>a</sup> - $r = 2,8 \times s_r$<br><sup>b</sup> - $R = 2,8 \times s_R$<br><sup>c</sup> - not applicable |             |             |                   |                   |                   |                   |

Table A.2 – Material composition

| Test Material | Ingredient          | Amount (kg) | Composition <sup>1</sup>                                                               |
|---------------|---------------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Blank         | Oats (peeled)       | 1,5         | Oats                                                                                   |
|               | Oats (black)        | 1,5         | Oats                                                                                   |
|               | Soya beans          | 1,5         | Soya                                                                                   |
|               | Rabbit feed         | 1,5         | Mixed cereals, carrots                                                                 |
|               | Bird feed mix       | 3           | Sunflower seeds, maize, oats, wheat, wild seeds, linseed                               |
| Level 1       | Compound pig feed   | 8           | Peas, soya, wheat, barley, tapioca, cabbage seeds, animal fat, corn, calcium carbonate |
| Level 2       | Compound horse feed | 8           | Barley flakes, oat flakes, maize flakes, plant oil, alfalfa, horse-mix pellets         |
| Level 3       | Horse muesli        | 2           | Oat, barley flakes, cornflakes, peas, molasses, plant oil                              |
|               | Rabbit feed         | 2           | Wheat, alfalfa, sunflower seeds, cabbage seeds, straw molasses, barley, roasted soya   |
|               | Compound pig feed   | 4           | Peas, soya, wheat, barley, tapioca, cabbage seeds, animal fat, corn, calcium carbonate |
|               | Horse sweets        | 0,5         | Unknown composition with carrots and vitamins A, D3 & E                                |
|               | Alfalfa             | 1           | Alfalfa                                                                                |
|               | Wheat               | 0,7         | Wheat                                                                                  |
|               | Soya/corn mix       | 2           | Soya/corn, 50% each                                                                    |

<sup>1</sup> In decreasing amounts.

**Annex B**  
(informative)  
**Chromatogram**

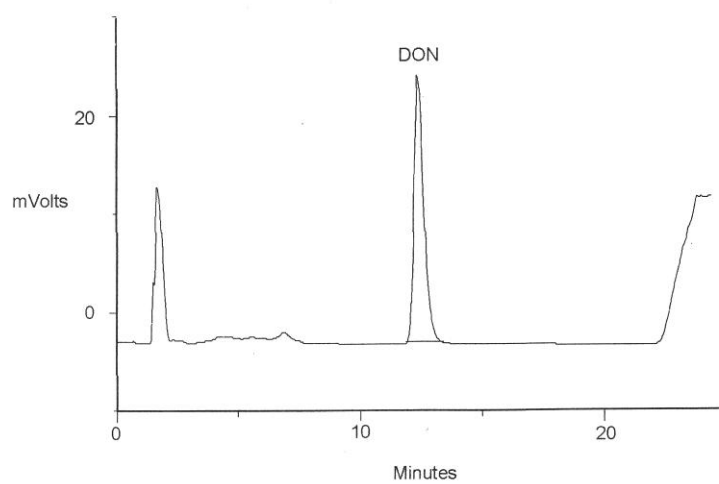


Figure B.1 — Naturally contaminated animal feed sample at approximately 2 mg/kg

## Bibliography

- 
- [1] Krska, R., et al., Determination of molar absorptivity coefficients for major type-B trichothecenes and certification of calibrators for deoxynivalenol and nivalenol. *Anal Bioanal Chem*, 2007. **388**(5-6): p. 1215-1226
  - [2] EC, COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 2006. **49**(L70): p. 12-34
  - [3] Stroka, J., et al., Liquid Chromatographic Determination of Deoxynivalenol in Baby Food and Animal Feed: Interlaboratory Study. *J AOAC Int*, 2006. **89**(4): p. 1012-1020
  - [4] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, p. 23-51

**Anexo E – Almeida, I., Martins, H.M., Santos, S., Costa, J.M., Bernardo, F. (2011). Co-occurrence of mycotoxins in swine feed produced in Portugal, *Mycotoxin Research*, DOI 10.1007/s12550-011-0093-8.**

Mycotox Res  
DOI 10.1007/s12550-011-0093-8

ORIGINAL PAPER

## Co-occurrence of mycotoxins in swine feed produced in Portugal

Inês Almeida · Hermínia Marina Martins ·  
Sara Santos · José M. Costa · Fernando Bernardo

Received: 17 December 2010 / Revised: 22 March 2011 / Accepted: 23 March 2011  
© Society for Mycotoxin Research and Springer 2011

**Abstract** A total of 404 samples of commercial swine feed from Portugal feed mills were analysed by HPLC methods for the presence of mycotoxins: 277 samples of feed for fattening pigs were analysed for ochratoxin A (OTA), zearalenone (ZEA), and deoxynivalenol (DON), and 127 samples of feed for sows were analysed for ZEA and fumonisins (FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub>). Concerning feed for fattening pigs, 21 (7.6%) samples were positive for OTA, (2–6.8 µg/kg), 69 (24.9%) were positive for ZEA (5–73 µg/kg), and 47 (16.9%) were positive for DON (100–864 µg/kg). In feed for sows, the results showed 29.9% of positive samples for ZEA (5–57.7 µg/kg) and 8.7% positive samples for FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> (50–391.4 µg/kg). Co-occurrence of DON/ZEA was found most frequently, but simultaneous contamination with OTA/ZEA and OTA/DON was also found.

**Keywords** Feed · Swine · Ochratoxin A · Zearalenone · Deoxynivalenol · Fumonisins

### Introduction

Cereals are a major source of protein in animal diets, becoming economically important in the feed chain, due to

the lack of national supplies and also the fact that their imports from 3rd countries relies on genetically modified varieties not always authorised at communitarian level, which conditions their availability. Those feed materials are known to be commonly colonised specially by *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Alternaria*, and other mould species, some of which are able to produce a large range of mycotoxins, which can be hazardous to animal health (Frisvad and Lund 1993).

Compound feedstuffs have an important role in swine husbandry, especially in intensive production which totally depends on them to fulfil animal needs. Although fungi contamination causes significant economic losses regarding deterioration of feed, mycotoxin contamination can cause acute and chronic mycotoxicoses in animals which causes decreasing swine productive and reproductive indexes, and also increasing the incidence of viral and bacterial infections by diminishing of immune response.

OTA is one of the most toxic secondary metabolites (Jakić-Dimić et al. 2009), known to cause mycotoxic porcine nephropathy (MPN) (Golinski et al. 1983). OTA is also immunosuppressive resulting in higher susceptibility to subclinical infections (Veldman et al. 1992). DON causes feed refusal, emesis and growth depression on swine (Vesonder et al. 1976). DON is also an inhibitor of protein and DNA synthesis affects food intake, body weight and suppresses humoral and cellular immune function (Pestka and Bondy 1990). ZEA has oestrogenic properties (Gouveia et al. 2005), and clinical manifestations can include vulvar swelling, reddening, rectal and vaginal prolapse (Rainey et al. 1991). According to Flowers et al. (1987), sows fed 20 mg of ZEA, presented prolonged oestrus cycles, and prolonged tax of interestrus, ranging between 28 and 74 days. It also leads to pseudo-gestation, significant reduction of conception tax, reduction of the size of the litter and piglets stillborn or weak (Malekinejad et al. 2006). FB<sub>1</sub> has been identified as

I. Almeida · J. M. Costa  
Direcção Geral de Veterinária,  
Largo da Academia Nacional de Bela Artes,  
nº 2, 1249–105 Lisboa, Portugal

H. M. Martins (✉) · S. Santos  
INRB-Laboratório Nacional de Investigação Veterinária,  
Estrada de Benfica,  
nº 701, 1500–610 Lisboa, Portugal  
e-mail: marina.martins@lniv.min-agricultura.pt

F. Bernardo  
Faculdade de Medicina Veterinária, Pólo Universitário da Ajuda,  
Rua Professor Cid dos Santos,  
1300–417 Lisboa, Portugal

Published online: 19 April 2011

 Springer

a natural cause of pulmonary edema and hepatic syndrome in swine (Scott 1993).

In Portugal, Martins et al. (2006) analysed mixed-feed and found 13.5% contaminated samples with ZEA, 30.7% with DON, while FB<sub>1</sub> was detected in 19.2% of these samples. In positive samples, simultaneously contamination with two or three mycotoxins was detected in 17.3% (9 out of 52 samples). Martins et al. (2008) conducted a similar study and reported that 2.1% of swine feed was contaminated with OTA, ZEA or DON, though without positive results for FB<sub>1</sub>. One result exceeded the European Commission guidance values (European Commission 2006) for sows and fattening pigs (250 µg/kg).

The prevention of the presence of mycotoxins in feeds must be ensured by an effective and efficient monitoring, avoiding the negative effects on swine production, which are properly documented. Within the European Union, maximum guidance values of 50 µg/kg for OTA, 900 µg/kg for DON, 250 µg/kg for ZEA and 5000 µg/kg for FBs have been set (European Commission 2006).

## Materials and methods

Samples of swine feed (for fattening pigs and sows) were randomly collected from manufacturers located in several regions of Portugal. Portugal is largely (70%) dependent on imported feed materials, either from other European Union member states or from non-EU suppliers. All feed mills or home-mixers at national level are approved according to European Union Regulation 183/2005 (European Union 2005) and therefore have a HACCP system implemented. However, the production conditions of raw materials obtained, especially of those imported from 3rd countries, are not thoroughly controlled.

A total of 277 samples of feed for fattening pigs were analysed for the presence of OTA, ZEA and DON, while 127 samples of feed for sows were analysed for ZEA and FBs. The selection of different analytes according to the type of feed resulted from a study made by national experts on mycotoxins affecting husbandry. Additionally, budgetary reasons had to be considered in this mycotoxin monitoring program.

The samples (approximately 500 g) were taken and prepared according to the method described by European Commission Regulation 152/2009 (European Commission 2009), and packed in appropriate containers for further laboratory analysis. The given data include both complete and complementary feeds, as samples were collected at feed mills and on-farm mixers.

The list of ingredients in feed for sows included barley, maize, colza husks, wheat, wheat husks, soy husks, citrine pulp, soy oils, molasses, calcium carbonate, dicalcium

phosphate, sodium chloride, oligoelements, vitamins E, A and D, aminoacids, conservants, anti-oxidants and agglomerants. Analytical constituents were labelled as crude protein (14.0%), crude fats and oils (3.6%), sodium (0.21%), crude cinder (5.3%), calcium (0.85%), phosphorus (0.5%), lysine (61%), methionine (25%).

The ingredients in feeds for fattening pigs were: maize, wheat, barley, soy husks obtained by extraction, wheat flour, colza husks obtained by extraction, toasted soy seeds, calcium carbonate, dicalcium phosphate, sodium chloride, soy oils, vitamins E, A and D, aminoacids, conservants, anti-oxidants and agglomerants. Analytical constituents were labelled as crude protein (17.5%), crude fats and oils (3%), crude fibre (5%), sodium (0.17%), crude cinder (6.3%), calcium (0.85%), phosphorus (0.6%), lysine (1.01%), methionine (0.28%).

## Chemicals

All reagents were of analytical grade. Solvents used for chromatography were all of analytical grade purity, provided by VWR (Germany). Standards of OTA, ZEA, DON and fumonisins was obtained from Sigma Chemicals (Spain). All reference standards were quantified prior to use by UV spectrometry. The immunoaffinity columns were purchased from Vicam L.P. (USA).

## Extraction and clean up of the samples

All the samples were finely grounded until they passed through a No. 20 sieve. The extraction and cleanup procedure of the samples for the analysis of OTA, ZEA, DON and FBs, and the conditions of HPLC procedure, were followed according to the procedures described below.

## HPLC analysis

OTA, ZEA, DON and fumonisins were analysed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection for OTA, ZEA and fumonisins, and UV detection for DON, after immunoaffinity column clean-up. Data were analysed with a computing integrator Merck Hitachi (Compaq Deskpro).

*Analysis of OTA* Was carried out following the method described by Stroka et al. (2009). The recovery study was performed using spiking levels of 120–200 µg/kg, recoveries were 98–103%, respectively. Detection limit of the method was 2 µg/kg.

**Analysis of ZEA** Was as described by Draft European Standard-prEn 15792 2009 (Anonymous 2009b). Working standards solutions, limit of detection and percentage of recovery were determined according to the method previously referred. The limit of detection was 0.005 mg/kg. Recovery was determined by spiking ZEA standards at levels of 5–100 µg/kg to corn samples, recoveries were 93–96%. Detection limit of the method was 5 µg/kg.

**Analysis of DON** Was carried out following the method described by Draft European Standard-prEn 15791 2009 (Anonymous 2009a). Recovery was determined by spiking DON standards at levels of 100–500 µg/kg to corn samples, recoveries were 85–98%. Detection limit of the method was 100 µg/kg.

**Analysis of FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>** Extraction, purification and HPLC quantification of FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> were performed by the technique described by Shephard et al. (1990). Recovery was determined by spiking FBs standards at levels of 100–500 µg/kg to corn samples, recoveries were 85–98%. The detection limit was 50 µg/kg for FB<sub>1</sub> and 100 µg/kg for FB<sub>2</sub>.

## Results and discussion

Results of mycotoxin analysis on feedstuffs for sows and feedstuffs for fattening pigs are shown in Table 1. The data were not corrected for recovery.

Concerning feed for fattening pigs, OTA was detected in 21 samples (7.6%) with levels ranging from 2 to 6.8 µg/kg (mean value=3.8 µg/kg). Out of these 21 samples, 7 were simultaneously contaminated with ZEA (ranging between 5–30 µg/kg). All the values found were very low. DON was detected in 47 samples with levels of 100–864 µg/kg. Only

4 samples had contamination values above 500 µg/kg, and none of the samples had contamination levels above the maximum guidance levels. Out of these 47 samples, 3 were simultaneously contaminated with OTA. ZEA was present in 69 samples (24.9%), exclusively at relatively low contamination levels of 5–73 µg/kg. While co-contamination of samples with DON and ZEA was found frequently, the co-occurrence of all three mycotoxins (OTA, ZEA and DON) was present in only one sample (2.8%).

In feedstuffs for sows, ZEA and FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub> were analysed. ZEA was found in 38 samples (29.9%). As shown in Table 1, 24 samples had contamination levels of 5–20 µg/kg, and 14 had contamination levels of 20–60 µg/kg. These levels are considered as very low, compared with the European Union guidance value of 250 µg/kg. FB<sub>1</sub> was present in 11 samples (8.7%) only, with levels of 50–390 µg/kg, again well below the guidance level of 5,000 µg/kg. Co-occurrence of ZEA and FB<sub>1</sub> was found in only two samples.

In an earlier survey of feed in Portugal, Martins et al. (2006) screened *Fusarium* toxins in feed for different animal species and found 13% contaminated samples with ZEA (7.4–61.4 µg/kg), 30.7% with DON (100–253 µg/kg), and 19.2% with FB<sub>1</sub> (50–110 µg/kg). In positive samples, simultaneous contamination with two or three mycotoxins was detected in 17.3% out of 52 samples. At that time, the study revealed higher percentages of contaminated samples with ZEA and higher co-occurrence, but also showed lower incidence of DON and FB<sub>1</sub>. In a further study conducted by Martins et al. (2008), it was reported that 2.1% of swine feed was contaminated with OTA, ZEA, or DON, though no positive results for FB<sub>1</sub> were observed. One result exceeded the recommended guidance values for sows and fattening pigs (250 µg/kg). Therefore, data showed an increasing of positive samples for OTA, ZEA and DON, but a decrease for FB<sub>1</sub>.

**Table 1** Mycotoxins in swine feed samples from Portugal

| Parameter                                                      | Feedstuffs for fattening pigs                                           |           |       |             |         |         | Feedstuffs for sows |             |        |         |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------|-------|-------------|---------|---------|---------------------|-------------|--------|---------|
|                                                                | OTA                                                                     | ZEA       |       | DON         |         |         | ZEA                 | FBs         |        |         |
| N+/N                                                           | 21/277                                                                  | 69/277    |       | 47/277      |         |         | 38/127              | 11/127      |        |         |
| Concentration range (µg/kg)                                    | 2–7                                                                     | 5–20      | 20–40 | 40–74       | 100–500 | 500–870 | 5–20                | 20–60       | 50–200 | 200–400 |
| N+in concentration range                                       | 21                                                                      | 50        | 12    | 7           | 43      | 4       | 24                  | 14          | 8      | 3       |
| % positives                                                    | 7.6                                                                     | 24.9      |       | 16.9        |         |         | 29.9                | 8.7         |        |         |
| Minimum (µg/kg)                                                | 2                                                                       | 5         |       | 100         |         |         | 5                   | 50          |        |         |
| Maximum (µg/kg)                                                | 6.8                                                                     | 73        |       | 864         |         |         | 57.7                |             |        |         |
| Mean (µg/kg)±SD                                                | 3.9 ±1.2                                                                | 18.9±17.9 |       | 223.2±181.1 |         |         | 19.4±14.5           | 163.7±127.8 |        |         |
| Frequency of co-occurrence of different mycotoxin combinations | OTA+ZEA: 7    OTA+DON: 3    ZEA+DON: 17    OTA+ZEA+DON: 1    ZEA+FBs: 2 |           |       |             |         |         |                     |             |        |         |

N+ Positive samples; N total sample number; SD Standard deviation

According to a survey conducted by Marques et al. (2008), who monitored *Fusarium* toxins within feed operators, 5 out of 261 samples were contaminated with deoxynivalenol, at levels ranging from 100 to 500 µg/kg. No positive cases for ZEA and FB<sub>1</sub> were identified in the analyses carried out. These results suggest that contamination of swine feed with those mycotoxins were very low, when compared to the results found by the authors of the present paper.

Comparing all the data with earlier data from Portugal (Marques et al. 2008; Martins et al. 2008), we may conclude that there is a continuous and similar frequency of mycotoxins over the years, mostly at relatively low concentration levels. Although some higher levels were observed for DON and ZEA in the present study, these were always lower than the European guidance levels. Comparing our results with some other recent studies from European countries underlines the relatively low mycotoxin levels in feeds from Portugal.

In Croatia, Klarić et al. (2009) studied the co-occurrence of aflatoxins, OTA, FBs and ZEA in 24 samples of cereals and 13 samples of feed collected in 2007 from households of an endemic nephropathy area. The most frequent mycotoxin was ZEA (92%, mean 318.3 µg/kg), followed by FBs, (27%, mean value=3,690 µg/kg) and OTA (16.2%, mean value=9.8 µg/kg). The levels of mycotoxins were below the recommended guidance values for animal feed; 29% of cereal was contaminated with FBs, OTA or ZEA in mass fractions above the recommended guidance values for humans. Co-occurrence of two mycotoxins varied between 4.2 and 54% and co-occurrence of three mycotoxins varied between 4.2 and 7.6%. Comparing the results obtained by Klarić et al. (2009), in general, mycotoxin levels reported by them revealed to have higher amounts of mycotoxins than in the present study; however, the results are still below the recommended guidance values for animal feed.

Monbaliu et al. (2010) analysed 82 samples for the presence of several mycotoxins (including DON, FBs, ZEA and OTA), and 67 (82%) were found to be contaminated; type B trichothecenes and FBs occurred most often, which represents an increase of mycotoxins incidence, when compared with our results (maximum=29.9% in ZEA).

Nevertheless, control measures should be enforced, allowing the evaluation of EU legislation in fulfilling and avoiding eventual risks for feed and the food chain and preventing animal health and welfare problems, by reducing the presence of mycotoxins in products intended for animal feed, with due regard to the substances' acute toxicity, bio-accumulability and degradability, in order to prevent undesirable and harmful effects.

In general, the risk management of mycotoxins in animal feed must include critical points for control, since good agriculture practice, climatic conditions or careful selection

of feed batches does not necessarily guarantee absence of mycotoxins. Also, official control must envisage a global monitoring of mycotoxins, especially concerning imports from 3rd countries.

In conclusion, our results show that OTA, ZEA, DON and FBs are still frequent contaminants in swine feed made in Portugal, although mostly at low levels. Slightly higher levels were only observed for DON and ZEA, but even for these toxins the levels found in feed were lower than the European Union guidance values.

## References

- Anonymous (2009a) Foodstuffs. Determination of deoxynivalenol in animal feed - high performance liquid chromatography method with ultraviolet detection and immunoaffinity column clean-up. Draft European Standard-prEn 15791 2009
- Anonymous (2009b) Animal feeding stuffs. Determination of zearalenone in animal feed- high performance liquid chromatography method with fluorescence detection and immunoaffinity column clean-up. Draft European Standard-prEn 15792 2009
- Commission E (2009) Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Off J Eur Comm L52(2009):1–30
- European Commission (2006) Commission recommendation (2006/576/EU) of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Off J Eur Comm. L229/2006:7–9
- Flowers B, Cantley T, Day BN (1987) A comparison of effects of zearalenone and estradiol benzoate on reproductive function during the estrus cycle in gilts. J Anim Sci 65:1576–1584
- Frisvad JC, Lund F (1993) Toxin and secondary metabolite production by *Penicillium* species growing in stored cereals. In: Scudamore K(ed) Occurrence and significance of mycotoxins. Central Science Laboratory, Slough, UK, pp 146–171
- Golinski P, Chelkowski J, Grabarkiewicz-Szczesna J, Szebiotko K (1983) Estimation of mycotoxic porcine nephropathy and ochratoxin A residues in porcine kidneys. Med Wet 39:407–408
- Gouveia MF, Guerra MM, Martins HM, Bernardo FM (2005) Mycoflora characterisation of swine feed. In: Proceedings Book of Congresso Ciências Veterinárias, Santarém, Portugal
- Jakić-Dimić D, Nešić K, Petrović M (2009) Mycotoxins in feed for pigs and poultry. Biotechnol Anim Husbandry 25:1149–1154
- Klarić MS, Cvetnić Z, Pepeljnjak S, Kosalec I (2009) Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and Zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography. Arh Hig Rada Toksikol 60:427–434
- Malekinejad H, Maas-Bakker R, Fink-Gremmels J (2006) Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. Vet J 172:96–102
- Marques MF, Martins HM, Costa JM, Bernardo F (2008) Incidence of *Fusarium* toxins in feeds marketed in Portugal. Proceedings 5th *Fusarium* Toxin Forum 10–11 January 2008, Brussels, Belgium. Available at: [http://www.micotossine.it/public/pag\\_555.pdf](http://www.micotossine.it/public/pag_555.pdf)
- Martins HM, Guerra MM, Bernardo F (2006) Zearalenone, Deoxynivalenol and Fumonisin in mixed-feed for laying hens. Mycotoxin Res 4:206–210
- Martins HM, Marques M, Almeida I, Guerra MM, Bernardo F (2008) Mycotoxin in feed stuff in Portugal: an overview. Mycotoxin Res 24:19–23

- Monbaliu S, Poucke CV, Detavernier C, Dumoulin F, Velde MV, Schoeters E, Dyck SV, Averkieva O, Peteghem CV, Saeger SD (2010) Occurrence of mycotoxins in feed as analysed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *J Agric Food* 58:66–71
- Pestka JJ, Bondy JS (1990) Alterations of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Can J Physiol Pharmacol* 68:1009–1016
- Rainey MR, Tubbs RC, Hardin DK, Cox NM (1991) Clinical manifestations of prepubertal exposure to zearalenone in gilts. *Agri-practice* 12:35–36
- Scott PM (1993) Mini review fumonisins. *Int J Food Microbiol* 18:257–270
- Shepherd GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WA (1990) Quantitative determination of fumonisin B1 and B2 by HPLC with fluorescence detection. *J Liq Chromatogr* 13:2077–2087
- Stroka J, Ambrosio M, Doncheva I, Lerda D, Mischke C, Breidbach A (2009) Validation of an analytical method to determine the content of ochratoxin A in animal feed. Report on the collaborative trial „Determination of Ochratoxin A in Animal Feed by Immunoaffinity Column Clean-up with High Performance Liquid Chromatography using Fluorimetry“, EUR 23657 EN – 2009. available from: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/11111111/4476/1/49205%20-%20eur%2023657%20-%20ochratoxin%20a%20in%20animal%20feed.pdf>
- Union E (2005) Regulation (EC) No 1831/2003 of the European parliament and of the council of 18 September 2003 laying down requirements for feed hygiene. *Off J Eur Comm* L35 (2005):1–22
- Veldman A, Borggreve GJ, Mulders EJ, Van De Lagemaat D (1992) Occurrence of the mycotoxins ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol in feed components. *Food Addit Contam* 6:647–655
- Vesonder RF, Ciegler A, Jensen AH, Rohwedder WK, Weisleder D (1976) Co-identity of the refusal and emetic principle from *Fusarium*-infected corn. *Appl Environ Microbiol* 31:280–285

**Anexo F - Almeida, I., Santos, S., Martins, H.M., Costa, J.M. (2011). Occurrence of Zearalenone and Deoxynivalenol in plant crops, 4th International Symposium Mycotoxins: Challenges and Perspectives, Ghent, Bélgica.**

NOTIFICATION OF ABSTRACT ACCEPTANCE AND REGISTRATION

The Scientific Committee has completed its evaluation of abstracts submitted for the *Fourth Mycotoxin Symposium "Mycotoxins: Challenges and Perspectives"*. I am happy to inform you that the abstract you submitted and entitled "Occurrence of Zearalenone and Deoxynivalenol in plant crops" has been accepted for poster presentation at the Symposium.

Posters should be prepared to clearly display the purpose, methods, results and conclusions. Lettering should be large enough to be viewed from 1.2 m away. The posters will be mounted on boards measuring 2m (height) x 1m (width). We suggest that you bring a limited number of reprints of your poster and of your business card which you could leave at your poster board when you are not present.

Our acceptance is conditional upon the registration of at least one of the authors (electronically through our website : [www.mytox.be](http://www.mytox.be)). If by the deadline of 15 April, 2011 we have not received your registration and payment, we will consider that you have withdrawn your abstract from our symposium and it will not be published in the Abstract Book.

Please do not hesitate to contact us, should you have questions or remarks (e-mail [marthe.deboever@ugent.be](mailto:marthe.deboever@ugent.be), +32(0)9/264.81.99 and [virginie.vandenbroucke@ugent.be](mailto:virginie.vandenbroucke@ugent.be) +32(0)9/264.73.24).

If necessary, please transmit this document to the co-author presenting the paper.

We thank you very much for your submission and look forward to the pleasure of meeting you in Ghent, 24th May, 2011.

Yours sincerely,

Prof. S. De Saeger

Chairman Organizing Committee

## Occurrence of Zearalenone and Deoxinivalenol in plant crops

Almeida, I.<sup>1</sup>, Santos, S.<sup>2</sup>, Martins, H. M.<sup>2</sup>, Costa, J.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Direcção Geral de Veterinária, Largo da Academia Nacional de Belas Artes, nº 2, 1249-105 Lisboa, Portugal;  
email: susana.freitas@dgv.min-agricultura.pt

<sup>2</sup>INRB, I.P., Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Serviço de Micologia, Estrada de Benfica 701,  
1549-011 Lisboa, Portugal; email: marina.martins@lniv.min-agricultura.pt

The pre-harvest field infection of plant crops by *Fusarium* spp. and by many other genera fungi across the feed chain may enhance moulds development and secondary metabolites production, like mycotoxins. Most *Fusaria* strains occur worldwide and some of them are found to be toxigenic (Martins & Martins 2002). The main objective of this study was to determine two *Fusaria* mycotoxins, Zearalenone and Deoxinivalenol, in crop samples intended for feed production. A total of 31 samples (palm kernel husks, soya, sorghum, wheat, niger seed, safflower sunflower seeds, corn, yeast and vetch) were randomly collected from feed industries. Zearalenone and Deoxinivalenol were determined by high performance liquid chromatography with fluorescence and UV-detection; the detection limits were 5 and 100 µg. kg<sup>-1</sup>, respectively. Out of 31 crop samples, 5 samples were zearalenone positive (soya - 2 samples, sorghum - 1 sample and sufflower seed - 2 samples) with levels ranging from 5 to 30µg.Kg<sup>-1</sup>. All samples revealed to be negative for DON's presence. The overall level of toxins contamination was low and did not exceed the legal maximum admissible by EU.

**Key words:** crops, *Fusarium* toxins, Zearalenone, Deoxynivalenol.

### Reference:

Di Menna, M. E., Lauren, D. R., & Smith, W. A. 1991. Effect of incubation temperature on zearalenone production by strains of *Fusarium crookwellense*. *Mycopathologia*, 116, 81-86.  
Martins, M.L. & Martins, H.M. 2002. Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. *Food Chemistry*, 79: 315-318.

**Anexo G - Almeida, I., Santos, S., Martins, H.M., Costa, J.M. (2011). Zearalenone and Deoxynivalenol in mixed-feed for swine, 4th International Symposium Mycotoxins: Challenges and Perspectives, Ghent, Bélgica.**

**NOTIFICATION OF ABSTRACT ACCEPTANCE AND REGISTRATION**

The Scientific Committee has completed its evaluation of abstracts submitted for the *Fourth Mycotoxin Symposium "Mycotoxins: Challenges and Perspectives"*. I am happy to inform you that the abstract you submitted and entitled "**Zearalenone and Deoxynivalenol in mixed-feed for swine**" has been accepted for poster presentation at the Symposium.

Posters should be prepared to clearly display the purpose, methods, results and conclusions. Lettering should be large enough to be viewed from 1.2 m away. The posters will be mounted on boards measuring 2m (height) x 1m (width). We suggest that you bring a limited number of reprints of your poster and of your business card which you could leave at your poster board when you are not present.

Our acceptance is conditional upon the registration of at least one of the authors (electronically through our website : [www.mytox.be](http://www.mytox.be)). If by the deadline of 15 April, 2011 we have not received your registration and payment, we will consider that you have withdrawn your abstract from our symposium and it will not be published in the Abstract Book.

Please do not hesitate to contact us, should you have questions or remarks (e-mail [marthe.deboever@ugent.be](mailto:marthe.deboever@ugent.be), +32(0)9/264.81.99 and [virginie.vandenbroucke@ugent.be](mailto:virginie.vandenbroucke@ugent.be) +32 (0)9/264.73.24).

If necessary, please transmit this document to the co-author presenting the paper.

We thank you very much for your submission and look forward to the pleasure of meeting you in Ghent, 24th May, 2011.

Yours sincerely,

Prof. S. De Saeger

Chairman Organizing Committee

## Zearalenone and Deoxynivalenil in mixed-feed for swine

Almeida, I<sup>1</sup>, Santos, S.<sup>2</sup>, Martins, H. M<sup>2</sup>., Costa, J.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Direcção Geral de Veterinária, Largo da Academia Nacional de Belas Artes, nº 2, 1249-105 Lisboa, Portugal;  
susana.freitas@dgv.min-agricultura.pt

<sup>2</sup>INRB, I.P., Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Serviço de Micologia, Estrada de Benfica 701,  
1549-011 Lisboa, Portugal; E-Mail: [marina.martins@lniv.min-agricultura.pt](mailto:marina.martins@lniv.min-agricultura.pt)

Zearalenone (ZEA) and deoxynivalenol (DON) are secondary metabolites produced by several *Fusarium* species. These species colonise cereal grains in the field and in storage. ZEA is an oestrogenic mycotoxin and DON cause's emesis and ingestion refusal in swine. These animals present great sensitivity for these toxins. The aim of this assay were to evaluate the natural contamination of 55 swine feed samples for the presence of DON and ZEA, using immunoaffinity columns for purification and HPLC for quantification. The detection limit was 5 and 100µg. kg<sup>-1</sup> and the recovery data was 93.0 and 98.0 for ZEA and DON, respectively. Out of 55 samples, 18 (32.7%) were positive for ZEA with levels ranging between 6.1 to 54.5 µg. kg<sup>-1</sup> (mean value = 21.3 µg. kg<sup>-1</sup>). Twelve samples (21.8%) were positive for DON, with levels ranging from 100 to 700 µg. kg<sup>-1</sup>(mean value = 559.2 µg. kg<sup>-1</sup>). In positive samples, co-occurrence of ZEA and DON were detected in 3 samples (5.5 %). All samples present results bellow the maximum limit allowed by European Union. The presence of ZEA and DON in finished swine feed requires periodic monitoring to prevent mycotoxicosis in animal production, reduce economic losses and minimize hazards to human health.

**Keywords:** Occurence, Swine Feed, Zearalenone, Deoxynivalenol