



Mestrado em Processos Químicos e Biológicos

Estudo e implementação de um sistema de testes rápidos para a avaliação de micotoxinas em aperitivos, frutos secos e desidratados em indústria alimentar

Tese para a obtenção do grau de Mestre em Processos Químicos e Biológicos

Autor

Ana Vanessa Andrade Pereira

Orientador

António Luís Pereira do Amaral

Supervisor

Joana Ferreira

Frutorra Pimenta, Lda.

Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Coimbra, Janeiro 2017

Agradecimentos

Antes de mais quero agradecer à D. Olga Pimenta e ao Doutor João Fernandes pela confiança e oportunidade em realizar o estágio

Quero agradecer ao meu orientador, professor António Luís Amaral por todo o apoio, disponibilidade e ajuda prestada, durante todo o período de estágio.

Um obrigado especial à minha supervisora, Joana Ferreira, por toda a amizade, boa disposição, ajuda, paciência e sabedoria transmitida.

A todos as pessoas colaboradoras da *Frutorra Pimenta, Lda.* pela ajuda, e por todo o carinho com que me acolheram e trataram.

Por fim, quero agradecer à minha família e amigos por todo o apoio, carinho e por me incentivarem a construir um futuro melhor.

Resumo

As micotoxinas são contaminantes de produtos alimentares produzidas por fungos filamentosos. Quando ingeridas as suas propriedades cancerígenas, nefrotóxicas, teratogénicas, imunotóxicas e neurotóxicas podem levar quer a intoxicações agudas quer a efeitos a mais longo prazo. De todas as micotoxinas conhecidas, as mais relevantes para o estudo em causa são as aflatoxinas e as ocratoxinas, já que são estas que têm maior incidência em frutos secos. De facto, o ataque por fungos filamentosos a estes produtos alimentares é bastante frequente, podendo iniciar-se durante o seu cultivo, armazenamento ou processamento do produto. Na indústria alimentar, as micotoxinas apresentam um elevado risco, em termos de segurança alimentar, e por isso o seu controlo neste tipo de indústrias deve ser rigoroso.

Tendo em atenção o descrito anteriormente, foram implementados, como medida de precaução, métodos de monitorização para o controlo de micotoxinas de modo a minimizar a ocorrência das mesmas nos produtos alimentares comercializados pela empresa *Frutorra Pimenta, Lda.*

No final deste trabalho de tese pode-se verificar que não foram identificados produtos alimentares, na empresa *Frutorra Pimenta, Lda.*, com valores de micotoxinas superiores aos valores máximos permitidos pela legislação. Contudo foram identificados alguns lotes de matérias-primas que suscitaram alguma preocupação e que mereceram uma análise mais cuidada. Em resultado deste facto, efetuou-se um estudo microbiológico da amostra que apresentou o maior valor de concentração de aflatoxinas totais, o qual apontou para um valor de 2×10^3 ufc/g, inferior ao valor máximo constante da legislação. Foi ainda possível de concluir que, no decorrer do processo de produção, existiu uma redução na concentração de micotoxinas após o processo de transformação, que variou em média entre 33,8% e 72,1% do valor inicial.

Finalmente foram também estudadas as condições (temperatura, humidade, concentração de oxigénio) de acondicionamento dos produtos alimentares, tendo-se verificado que são maioritariamente adequadas para os produtos em questão.

Palavras-Chave: Micotoxinas, aflatoxinas, ocratoxinas, *Aspergillus*, *Penicillium*, método ELISA

Abstract

Mycotoxins are food contaminants, produced by filamentous fungi. When ingested their carcinogenic, nephrotoxic, teratogenic, immunotoxic and neurotoxic properties can lead to serious intoxications as well as to long term effects. Of all known mycotoxins, aflatoxins and ochratoxins are the most relevant in pulses and oil seeds. In fact, fungi contaminations are quite frequent in such food products, and may start during cultivation, storage or product processing stages. In the food industry mycotoxins present a high risk, in terms of food safety, and therefore its control must be strict in this type of industries.

Taking the above into consideration, monitoring methods for mycotoxins control were implemented, as a precautionary measure, in order to minimize their occurrence in the food products commercialized by *Frutorra Pimenta, Lda.*

As a result, it could be concluded that no food products, within *Frutorra Pimenta, Lda.*, were observed presenting mycotoxins values above the maximum permitted by law. However some batches of raw materials did raise some concerns, and deserved a more careful analysis. As a result of this, the microbiological study performed to the most contaminated sample (with regard to total aflatoxins), pointed to a value of 2×10^3 cfu / g, lower than the maximum permitted by law. Furthermore, it was also possible to conclude that, after the production process, there was a reduction in the mycotoxins concentration, between 33.8% and 72.1%, on average, of the initial value.

Finally, the product storage conditions (temperature, humidity, oxygen concentration) were also investigated, and it could be verified that they were suitable for the products in question.

Keywords: Mycotoxins, aflatoxins, ochratoxins, *Aspergillus*, *Penicillium*, ELISA method

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo.....	iii
Abstract	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	viii
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento do tema	1
1.2. Objetivos e metodologias	2
1.3. Estrutura da dissertação	3
2. Apresentação da fábrica e processo de fabrico dos alimentos	5
2.1. Historial da empresa	5
2.2. Descrição das etapas do processo	5
2.3. Fluxogramas do processo de fabrico.....	11
3. Fungos produtores de micotoxinas.....	14
3.1. Bolores e leveduras	15
3.2. <i>Aspergillus</i>	17
3.3. <i>Penicillium</i>	18
4. Micotoxinas	19
4.1 Aflatoxinas.....	20
4.2 Ocratoxina A.....	22
4.3 Outras micotoxinas não estudadas no presente trabalho.....	23
4.3.1 Zearalenona.....	23
4.3.2 Patulina.....	23
4.3.3 Fumonisina	23
4.3.4 Desoxinivalenol	24
5. Principais alimentos analisados	26
5.1 Propriedades dos alimentos estudados	26
5.1.1 Sultanas/Passa de uva/corintos	26
5.1.2 Amendoim	26
5.1.3 Amêndoa	26
5.1.4 Caju.....	27
5.1.5 Pistacho	27
6. Métodos de análise implementados na <i>Frutorra Pimenta</i>	28

6.1	Definições importantes e componentes do método ELISA.....	28
6.2	Método ELISA	29
6.3	Colunas de imunoafinidade.....	32
7.	Procedimento experimental e análise dos resultados.....	35
7.1	Procedimento experimental	35
7.1.1	Determinação de aflatoxinas	35
7.1.2	Determinação da ocratoxina A.....	36
7.1.3	Contagem de bolores e leveduras.....	37
7.2	Resultados e análise de resultados	38
7.2.1	Dados complementares	38
7.2.2	Aflatoxinas totais.....	40
7.2.3	Aflatoxina B ₁	46
7.2.4	Ocratoxina A.....	47
7.2.5	Contagem de bolores e leveduras.....	47
8.	Conclusões.....	50
9.	Referências bibliográficas	52
10.	Anexos.....	I
10.1	Regulamentos aplicáveis	I
10.1.1	Secção 2 do Anexo do Regulamento (CE) Nº1881/2006 da Comissão Europeia de 19 de Dezembro de 2006	I
	Anexo do Regulamento (CE) Nº 165/2010 da Comissão Europeia de 26 de Fevereiro de 2010.....	III
10.1.2	Curva de calibração das aflatoxinas totais	IV
10.1.3	Curva de calibração da aflatoxina B ₁	XI
10.1.4	Curvas de calibração da ocratoxina A	XIII
10.1.5	Contagem de bolores e leveduras.....	XIV

Índice de figuras

Figura 1 – Localização da fábrica <i>Frutorra Pimenta, Lda.</i>	5
Figura 2 – Forno da torra do amendoim	7
Figura 3 – Interior do forno, durante a torra do amendoim.....	8
Figura 4 – Forno de Joper.....	8
Figura 5 – Fritadeira contínua.	9
Figura 6 – Fritadeira descontínua.....	9
Figura 7 – Zona de embalagem.	10
Figura 8 – Fluxograma da linha de produção para os produtos fritos.	11
Figura 9 – Fluxograma da linha de produção para os produtos torrados.....	12
Figura 10 – Fluxograma da linha de produção para os produtos de escolha/embalados.	13
Figura 11 – Imagem ao microscópio de um fungo filamentoso. (Legenda: 1- Hifa, 2 - Esporângio, 3 - Esporos, 4 - Septos)	14
Figura 12 – Contaminação por um bolor.	16
Figura 13 – Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> observada ao microscópico eletrónico.	16
Figura 14 – Género <i>Aspergillus</i> (<i>A. flavus</i>) observado ao microscópico eletrónico.....	18
Figura 15 – Género <i>Penicillium</i> observado ao microscópico ótico (após coloração).....	18
Figura 16 – Conjunto de fatores necessários para a produção de micotoxinas (M) num alimento.	20
Figura 17 – Estrutura química das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	21
Figura 18 – Estrutura química da ocratoxina A(Khoury e Atoui 2010).....	22
Figura 19 – Artigos publicados desde meados da década de 90 até finais de 2004 sobre as micotoxinas mais investigadas.	24
Figura 20 – Sequência de etapas num teste ELISA competitivo.	31
Figura 21 – Leitor <i>Stat Fax 4700</i> usado nas análises de micotoxinas.	32
Figura 22 – <i>Kit Ridascreen</i> para a determinação de micotoxinas.	32
Figura 23 – Princípio base do método utilizando colunas de imunoafinidade.	33
Figura 24 – Coluna de imunoafinidade <i>Rida Ochratoxin A column</i>	34
Figura 25 – Placas de Petri ao fim de 5 dias de incubação por incorporação para o lote 1886. (A) Diluição 10 ⁻² ; (B) Diluição 10 ⁻³	48
Figura 26 – Imagens microscópicas das colónias com crescimento nas diluições 10 ⁻¹ e 10 ⁻² . (Ampliação 40x).....	49
Figura 27 – Representação gráfica da curva de calibração das aflatoxinas totais.	VI
Figura 28 – Curvas de calibração obtidas para o teste da aflatoxina B ₁	XI
Figura 29 – Curvas de calibração obtidas para os ensaios realizados para o teste da ocratoxina A.	XIII

Índice de tabelas

Tabela 1 – Principais micotoxinas e limites máximos toleráveis ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ ou ppb) segundo os Regulamentos (CE) N ^o 1881/2006, N ^o 629/2008 e N ^o 165/2010.	25
Tabela 2 – Temperaturas médias e duração do processo de transformação dos produtos torrados.	38
Tabela 3 – Temperaturas médias e duração do processo de transformação dos produtos fritos.	38
Tabela 4 – Temperaturas e humidades médias das secções da instalação industrial da <i>Frutorra Pimenta, Lda</i> nos meses de Novembro de 2015 a Março de 2016.	39
Tabela 5 – Temperaturas e humidades médias das secções da instalação industrial da <i>Frutorra Pimenta, Lda</i> nos meses de Abril a Julho de 2016.	39
Tabela 6 – Percentagem de oxigênio presente em cada embalagem de produto final.	39
Tabela 7 – Concentrações totais de aflatoxinas calculadas e reais para os produtos fritos (caju e amendoim), antes (1) e após (2) a fritura.	41
Tabela 8 – Concentrações totais de aflatoxinas calculadas e reais, para os produtos torrados, antes (1) e após (2) a torra.	43
Tabela 9 – Concentrações totais de aflatoxinas calculadas e reais para as amêndoas transformadas, antes (1) e após (2) a transformação.	44
Tabela 10 – Concentrações totais de aflatoxinas calculadas e reais para as amêndoas sem transformação na unidade industrial da <i>Frutorra Pimenta, Lda</i>	45
Tabela 11 – Resultados das concentrações de aflatoxina B ₁ dos produtos analisados.	46
Tabela 12 – Concentrações de ocratoxina A para os produtos analisados, suscetíveis de contaminação.	47
Tabela 13 – Resultados obtidos para a contagem de bolores de leveduras para o lote 1886. ...	48
Tabela 14 – Teores máximos de aflatoxinas e de ocratoxinas segundo a secção 2 do regulamento N ^o 1881/2006 de 19 de Dezembro de 2006.	I
Tabela 15 – Teores máximos de aflatoxinas segundo o regulamento N ^o 165/2010 de 26 de Fevereiro de 2010.	III
Tabela 16 – Valores retirados do certificado de qualidade do <i>kit</i> das aflatoxinas totais para construção da curva de calibração.	IV
Tabela 17 – Valores de absorvâncias obtidas e concentrações calculadas através dos valores percentuais BB0 fornecidos no certificado de qualidade.	V
Tabela 18 – Valores de Logit e de Log para a construção da curva de calibração das aflatoxinas totais.	VI
Tabela 19 Valores das absorvâncias obtidas para os produtos fritos (caju e amendoim), antes (1) e após (2) a fritura.	VII
Tabela 20 Valores das absorvâncias obtidas dos produtos torrados (Amendoim e pistacho) antes (1) e após (2) torra.	VIII
Tabela 21 Valores de absorvências obtidas para as amêndoas transformadas, antes (1) e após (2) a transformação.	IX
Tabela 22 Valores de absorvências obtidas para as amêndoas sem transformação.	X
Tabela 23 – Valores de absorvências obtidas para o cálculo do Logit com a finalidade de obter as curvas de calibração.	XI
Tabela 24 – Curva de calibração utilizada para cada produto alimentar.	XII
Tabela 25 Valores de absorvências para os produtos analisados.	XII

Tabela 26 – Valores de absorvâncias obtidas para o cálculo do Logit com a finalidade de obter as curvas de calibração.	XIII
Tabela 27 – Curva de calibração utilizada para o respectivo produto.....	XIV
Tabela 28 Valores de absorvâncias para os produtos analisados.....	XIV

Simbologia e nomenclatura

a_w – Atividade de água

AFT – Aflatoxinas totais

AFB₁ – Aflatoxina B₁

AFB₂ – Aflatoxina B₂

AFG₁ – Aflatoxina G₁

AFG₂ – Aflatoxina G₂

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

B - Absorvância

B₀ - Absorvância de concentração 0

CE - Comissão Europeia

Conc - Concentração

C - Número de colónias

DON – Desoxivalenol

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FEFO - *First-Expire, First Out*

FIFO - *First In, First Out*

GC – Cromatografia gasosa

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HT₂ – Hidrotoxina T₂

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IgG - Imunoglobina

Logit - Função logística

Ln - Logaritmo natural

LC – Cromatografia líquida

n1 - Número de placas da 1º diluição

n2 - Número de placas da 2º diluição

OTA – Ocratoxina A

ppb – Partes por bilhão

T₂ – Fusariotoxina T₂

ufc – Unidades formadoras de colónias

UV – Ultravioleta

1. Introdução

1.1. Enquadramento do tema

Atualmente, o controlo dos níveis tóxicos em alimentos é uma preocupação global uma vez que estes provocam danos quer ao nível económico quer ao nível da saúde do consumidor. Uma vez que a principal via de exposição é através da ingestão de alimentos contaminados, as autoridades têm implementado ações para diminuir a ingestão destes compostos.

As micotoxinas são um grupo de pequenas moléculas orgânicas, com reconhecida atividade tóxica, produzidas como metabolitos secundários por alguns fungos filamentosos encontrados em muitos cereais e produtos cultivados. Em produtos agroalimentares podem ser consideradas de origem natural, sendo tóxicas para os seres humanos e animais quando ingeridas ou inaladas, ainda que em pequenas quantidades (Venâncio e Paterson 2007). Por isso torna-se importante o seu controlo para que não ocorra risco para a saúde pública. A área que se ocupa destes estudos é a micotoxicologia, debruçando-se especificamente sobre a produção de micotoxinas por fungos filamentosos. Com as frequentes pesquisas, já se encontra identificado um grande número de micotoxinas, sendo as mais importantes as aflatoxinas, devido à sua elevada toxicidade.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, cerca de 25% de todas as colheitas mundiais de cereais estão, de alguma forma, contaminadas (Pereira, et al. 2012). A principal causa da contaminação dos alimentos, por micotoxinas, deve-se a fatores ambientais e biológicos. O período de 2002 a 2008 apresentou um aumento considerável de notificações relacionadas com micotoxinas, porém nos anos seguintes, o número de notificações diminuiu. Estudos da Comissão Europeia, datando de 2011, concluem ainda que as aflatoxinas foram as mais relatadas seguidas da ocratoxina (European Commission, 2011).

As micotoxinas são produzidas principalmente por espécies de fungos que pertencem aos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* e ainda *Claviceps* e *Paelomyces* (Soares, et al. 2013). Estes fungos podem ser responsáveis pela deterioração de alimentos, e pela produção de micotoxinas, sendo importante, por isso, possuir métodos convenientes e confiáveis para medir o seu crescimento. Contudo, o crescimento dos fungos não é tão fácil de quantificar como as bactérias e leveduras, já que estes não crescem como células individuais, mas sim como micélio (hifas filamentosas) (Pitt 1984). A contaminação de um alimento por parte dos fungos depende de muitos aspetos, destacando-se entre eles a atividade de água, oxigénio, temperatura, tipo de substrato e pressão osmótica. Saliente-se ainda que a formação de micotoxinas pode começar antes ou depois da colheita, no armazenamento ou no seu embalamento, e a

identificação das micotoxinas e respetiva avaliação quantitativa requer a preparação das amostras, utilização de métodos de extração e técnicas de análise quantitativa.

Várias micotoxinas exercem os seus efeitos de diferentes formas, sendo que a sua toxicidade varia em função das características da micotoxina, mas não só. Nomeadamente, os seus efeitos no consumidor dependem de vários fatores, como a idade, o peso, a dose e via de exposição. A título de exemplo, as aflatoxinas e as ocratoxinas interferem com a formação de proteínas, mas cada uma de diferente forma (Zaki, et al. 2011). Estas substâncias foram ainda classificadas como cancerígenas, e quando ingeridas em níveis elevados na alimentação podem levar a problemas agudos e até à morte. Entre outros, podem surgir sinais de debilidade imunitária, atraso no crescimento e surgimento de lesões oncológicas, mutagénicas, teratogénicas, citotóxicas, neurotóxicas, nefrotóxicas e estrogénicas. Em termos de exposição e gravidade, as micotoxinas apresentam um risco maior do que a maior parte dos contaminantes, pesticidas e aditivos alimentares. Na sua ação de decomposição dos alimentos, quase todas são citotóxicas, provocando a rotura de membranas celulares e outras estruturas, ou interferindo na síntese proteica.

Face ao perigo que constituem, nos últimos anos tem havido uma intensa investigação com o propósito de detetar e prevenir a existência destas substâncias nos alimentos. Deste modo, apenas algumas micotoxinas são regularmente encontradas em alimentos e rações animais como grãos e sementes, leite, legumes e frutas (Magan e Olsen 2004). Por outro lado, os animais também podem estar sujeitos a contaminação, e a ingestão da carne e do leite destes animais levar à contaminação humana (Kwiatkowski e Alves 2007).

Como apresentam uma grande estabilidade térmica, as micotoxinas não são destruídas pelo calor, sobrevivendo às principais etapas do processamento térmico alimentar (Hussein e Brasel 2001). Como os níveis destas toxinas nos alimentos podem não ser completamente removidos no fornecimento de alimentos, muitos países definiram regulamentos para os limites máximos toleráveis das mesmas.

1.2. Objetivos e metodologias

O presente trabalho de tese foi realizado com o objetivo de determinar a contaminação por micotoxinas, ao longo da cadeia de produção, na empresa *Frutorra Pimenta, Lda.* nomeadamente a presença de aflatoxinas e ocratoxinas em alimentos como amendoins, pistachos, amêndoas, passas de uvas/sultanas/corintos, entre outros. Tendo em vista a minimização da sua ocorrência, fizeram-se estudos a diferentes níveis:

- Realizou-se um levantamento dos níveis de toxinas nos produtos comercializados desde a sua chegada na fábrica (matéria-prima), após a transformação do produto e após o seu embalamento até à sua saída da

fábrica. Desta forma, foi possível identificar pontos críticos na contaminação dos diferentes géneros alimentares estudados.

- Realizou-se um estudo de contagem de bolores e leveduras, potencialmente patogénicos, a 25 °C como forma indireta de avaliar a presença de fungos produtores de micotoxinas em lotes de alimentos identificados como possuindo valores elevados de toxinas.

As técnicas convencionais para análise de micotoxinas incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC) e líquida (LC), entre outras. Contudo, o elevado custo de equipamento, manutenção, aquisição de reagentes e exigência ao nível da duração das análises limitam o seu uso. Como alternativa, para se determinar a presença de aflatoxinas e ocratoxina pode-se recorrer ao método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando os *kits Ridascreen (R-Biopharm, Pfungstadt, Alemanha)*.

1.3. Estrutura da dissertação

Este trabalho encontra-se organizado em 10 capítulos do seguinte modo:

Começa-se por enquadrar o tema do trabalho de tese no **primeiro capítulo**, com uma breve introdução do trabalho apresentação da temática estudada e definição dos objetivos do mesmo.

O **capítulo dois** apresenta a unidade industrial da *Frutorra Pimenta, Lda.* local onde foi implementado o método estudado. Neste capítulo é dado especial ênfase ao processo de fabrico dos alimentos e nas transformações que eles sofrem nesta empresa.

O **terceiro e o quarto capítulo** apresentam uma revisão bibliográfica, isto é, uma explicação mais detalhada sobre o tema em estudo, respetivamente sobre os principais fungos produtores de micotoxinas e as micotoxinas comumente presentes em alimentos secos e desidratados.

O capítulo seguinte, **quinto capítulo**, apresenta informações sobre os principais alimentos analisados, desde a sua composição química, à sua origem e época de colheita, entre outros.

No **sexto capítulo** é referido o método implementado na empresa, e utilizado no decurso deste trabalho, apresentando a metodologia experimental usada.

No **sétimo capítulo** é apresentado o procedimento experimental deste trabalho, assim como os principais resultados experimentais e no **oitavo capítulo** são abordadas as conclusões finais do trabalho realizado.

O **nono e décimo** capítulo referem-se respetivamente às referências bibliográficas usadas e aos anexos.

2. Apresentação da fábrica e processo de fabrico dos alimentos

2.1. Historial da empresa

A *Frutorra Pimenta, Lda*, inaugurada em 1988, é uma empresa inserida no mercado nacional, com sede em Degraças-Soure. Tem como principal missão a produção e comercialização de aperitivos, frutos secos e desidratados.

Esta empresa surge por aquele que viria a ser um dos fundadores da ideia de torrar amendoins na própria residência com a finalidade de os vender em cafés locais. Ao denotar a capacidade de crescimento, e pouca concorrência deste sector, decide apostar na sua expansão criando instalações apropriadas. Atualmente é considerada uma das maiores fábricas do país no ramo de transformação e embalamento de frutos secos.

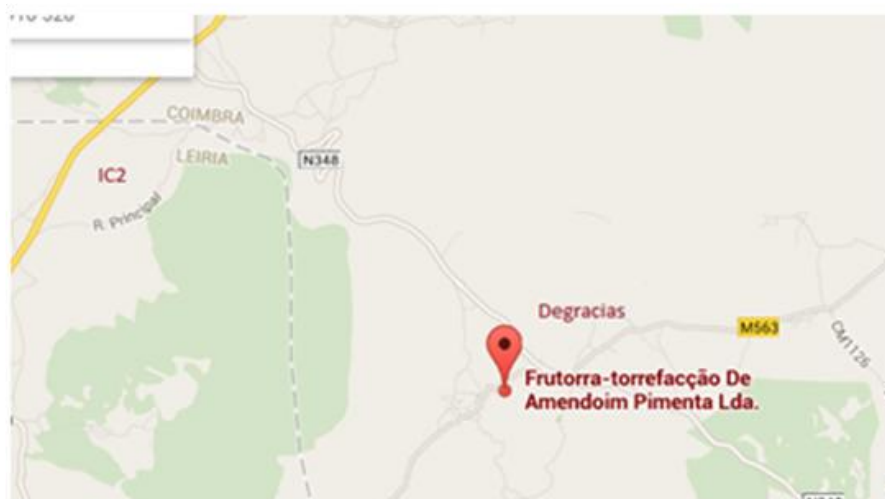


Figura 1 – Localização da fábrica *Frutorra Pimenta, Lda*.

Como referido anteriormente, a *Frutorra Pimenta, Lda*. dedica-se à transformação e embalamento de frutos secos, nomeadamente, amendoins, pistachos, cajus, pevides, nozes, amêndoas, ameixas, alperces, tâmaras, figos, sultanas, corintos, milho e passas de uvas, entre muitos outros. Muitos desses produtos provêm dos E.U.A, China, México, Turquia e Argentina, entre outros.

2.2. Descrição das etapas do processo

A linha de produção inicia-se na receção das matérias-primas, armazenamento, transformação, embalamento, expedição e distribuição. A transformação dos alimentos, adquiridos em cru, engloba essencialmente a torra e a fritura. De seguida encontram-se listadas as principais etapas da linha de produção da *Frutorra Pimenta, Lda*.

2.2.1. Receção de matérias-primas

As matérias-primas são recebidas nos armazéns de matérias-primas sendo seguidamente inspecionadas. Na verificação do produto observam-se as características organoléticas, rotulagem existente, acondicionamento do produto, estado da embalagem e calibre do produto, de acordo com as especificações do fornecedor. A todas as matérias-primas é atribuído um lote interno.

2.2.2. Armazenamento das matérias-primas

As matérias-primas são seguidamente armazenadas em prateleiras, ou estantes de carga, de acordo com os sistemas FEFO (*First Expired, First Out*) e FIFO (*First In, First Out*).

2.2.3. Escolha de produtos

No caso de produtos que são apenas reembalados, estes sofrem uma etapa de escolha, sendo colocados numa mesa de rede e inspecionados de modo a eliminar qualquer perigo físico detetável a olho nu.

2.2.4. Salmoura

Esta é uma etapa requerida apenas para pistachos, pevides, miolo de pevide e favas. A estes produtos é adicionado sal e água, numa betoneira com agitação, podendo ficar até três dias em salmoura, seguindo posteriormente para a torra.

2.2.5. Abastecimento

Nesta etapa do processo o abastecimento das linhas de transformação pode ser feito de várias formas, de acordo com o produto alimentar:

- Torra: Este processamento pode ser efetuado para o caso dos amendoins, pistachos, amêndoas, pevides e miolo de pevide. O produto alimentar é colocado em silos de abastecimento, seguindo para o forno de torra através de um tapete de escolha que permite visualizar o produto alimentar.
- Fritadeira: O produto a fritar passa por uma rede incorporada no silo da fritadeira para que o produto partido possa ser retirado. O produto aceite é direcionado seguidamente para o silo de abastecimento e cai por gravidade para a fritadeira.
- Embalamento: O produto final é colocado nos silos de abastecimento sendo direcionado, por gravidade, para as máquinas de embalar.

2.2.6. Torra

O processo de torra é efetuado principalmente no caso dos produtos amendoim, em forno de bola de torra, e pistacho, amêndoa, pevide e miolo de pevide em forno de Joper. O amendoim com casca é colocado dentro de um forno de bola de torra, com temperatura de chama entre 210 °C a 420 °C, que possui um movimento rotacional, durante cerca de 3 h. Durante este processo a temperatura média de torra do amendoim é de cerca de 300 °C. Durante o processo de torra são retiradas amostras de amendoins, para verificação do processo de torra, com a ajuda de uma *provadeira* (tubo com

abertura que se insere até ao centro da bola de torra). Depois de torrado, o amendoim é arrefecido e limpo por um sistema de sopro.

No forno de torra (*Joper, Canelas, Portugal*) são torrados pistachos, amêndoas, pevides e miolo de pevide. Este processo decorre durante 15 a 20 minutos a temperaturas de chama entre 160 °C a 210 °C. Para estes produtos alimentares, a temperatura média de torra é cerca de 130 °C. De igual forma que os amendoins, são retiradas pequenas quantidades deste produto do forno, com a ajuda de uma *provadeira*, para verificação do processo de torra. No final deste processo, estes produtos são depositados num arrefecedor com pás giratórias entre 5 a 10 minutos. Finalmente, o produto final passa para uma mesa de rede onde é inspecionado.

Nas seguintes figuras é possível visualizar os dois fornos usados no processo descrito anteriormente.



Figura 2 – Forno da torra do amendoim



Figura 3 – Interior do forno, durante a torra do amendoim.



Figura 4 – Forno de Joper.

2.2.7. Fritura

Os produtos fritos fabricados na *Frutorra Pimenta, Lda.* englobam o amendoim despelado, caju, amêndoa e favas (sendo que este último não foi alvo do presente estudo), podendo este processo ser efetuado numa fritadeira contínua ou em fritadeiras pequenas (sistema descontínuo). Em ambos os casos, a temperatura do óleo de fritura varia entre 120 °C a 180 °C, consoante o produto a ser frito, atingindo-se uma temperatura média do produto alimentar entre 135 °C e 145 °C.

Na fritadeira contínua o tapete transportador do produto é imerso em óleo quente, com a velocidade regulada para a fritura decorrer entre 3 a 8 minutos, de acordo com o produto a fritar. Depois de frito, o produto passa para um arrefecedor, depois para um tambor giratório onde é temperado, e finalmente, para uma plataforma vibratória com rede para

se retirar o excesso de sal. Nas fritadeiras pequenas o produto é colocado em cestos de rede e depois imergido em óleo quente durante cerca de 20 minutos. Depois de frito o produto é colocado numa mesa de rede para ser efetuado o tempero e a inspeção visual.

No final o produto é acondicionado sendo transportado para o local de abastecimento do embalamento. As seguintes figuras mostram as duas fritadeiras utilizadas.



Figura 5 – Fritadeira contínua.



Figura 6 – Fritadeira descontínua.

2.2.8. Embalamento

Na etapa do embalamento, o produto é dirigido, por ação da gravidade, para a entrada de um sistema de multicabeças que efetua a descarga para as fotocélulas de pesagem automática até perfazer o peso pretendido. Consoante o produto alimentar, as

embalagens podem conter quantidades (gramagens) desde 25 g a 1 Kg. Aquando deste processo, é injetado azoto para dentro da embalagem, de modo a expelir o oxigénio e tornar a atmosfera inerte, e esta é fechada hermeticamente por um processo térmico. De seguida, as embalagens passam por um detetor de metal, sendo rejeitadas automaticamente caso acusem a presença de algum contaminante metálico. Adicionalmente, a cada duas horas é retirada uma embalagem e feita a medição da percentagem de O₂ no seu interior, para controlo do processo.

Todos os pacotes (embalagens) não rejeitados passam por um controlador de peso final que faz a pesagem e o registo das mesmas. No final, todos os pacotes (embalagens) aceites passam para uma mesa giratória para acondicionamento, primeiro em caixas de cartão ou sacos de plástico e, seguidamente, em paletes (paletização). A figura seguinte representa a zona de embalamento da *Frutorra Pimenta, Lda*.



Figura 7 – Zona de embalamento.

2.2.9. Armazenamento

Durante a etapa de armazenamento, as paletes são colocadas em prateleiras de carga de acordo com os sistemas FEFO (*First Expired, First Out*) e FIFO (*First In, First Out*) de modo a que o lote mais antigo seja o primeiro a ser expedido.

2.2.10. Expedição

Nesta etapa, as paletes, depois de acondicionadas com o filme poliestirável *Vitafilm* (SEVIP, Leiria), são conferidas através de um sistema informático, com a finalidade de confirmar se todos os dados correspondentes aquele lote estão corretos. Por fim, as paletes são colocadas no cais de expedição e posteriormente carregadas nas viaturas de distribuição.

2.3. Fluxogramas do processo de fabrico

Os fluxogramas são uma forma esquemática de apresentar as fases do processo produtivo, consoante as etapas de preparação afetas a cada produto (receção da matéria-prima, armazenamento, processamento, armazenamento e expedição. Nas figuras seguintes encontram-se apresentados os fluxogramas da linha de produção para os produtos fritos, torrados e de escolha/embalados.

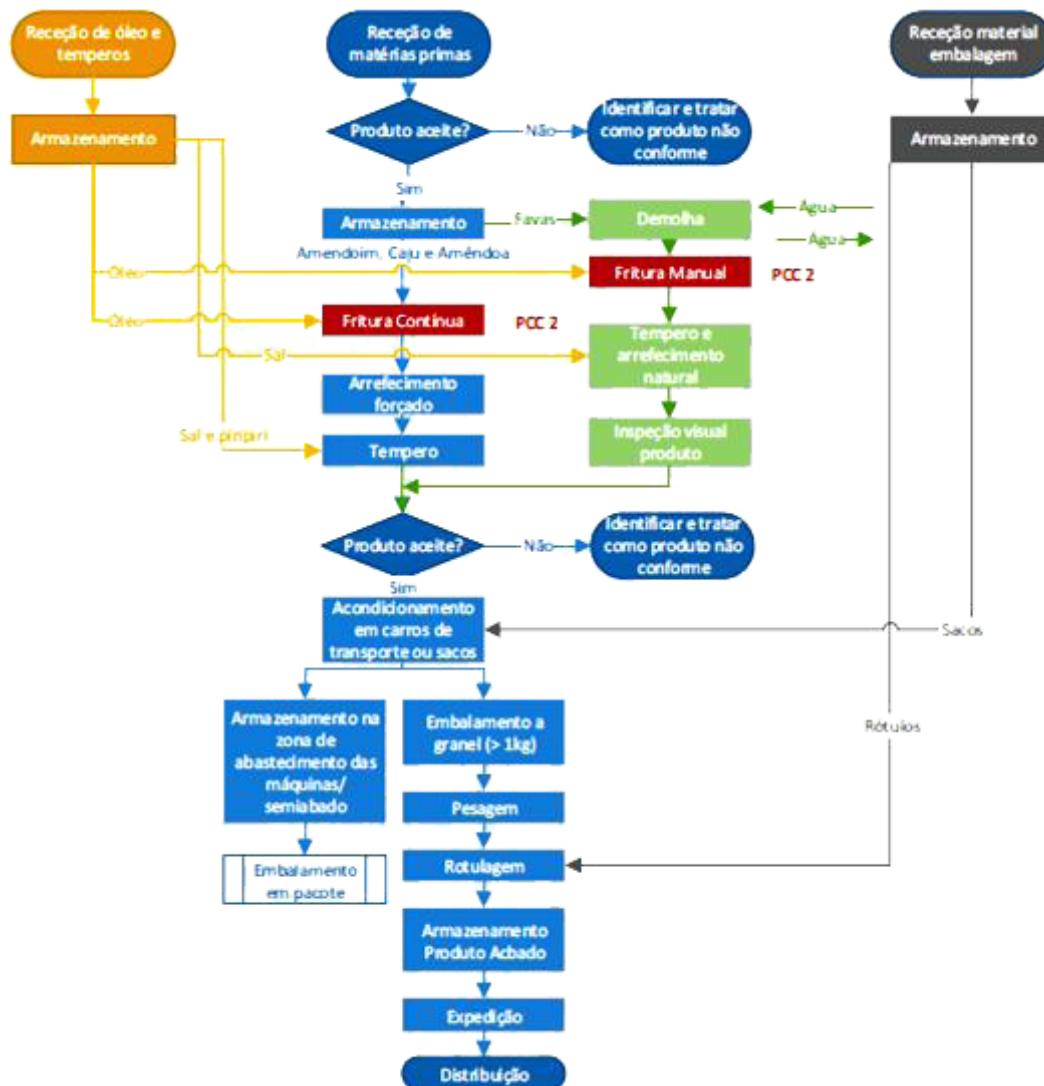


Figura 8 – Fluxograma da linha de produção para os produtos fritos.

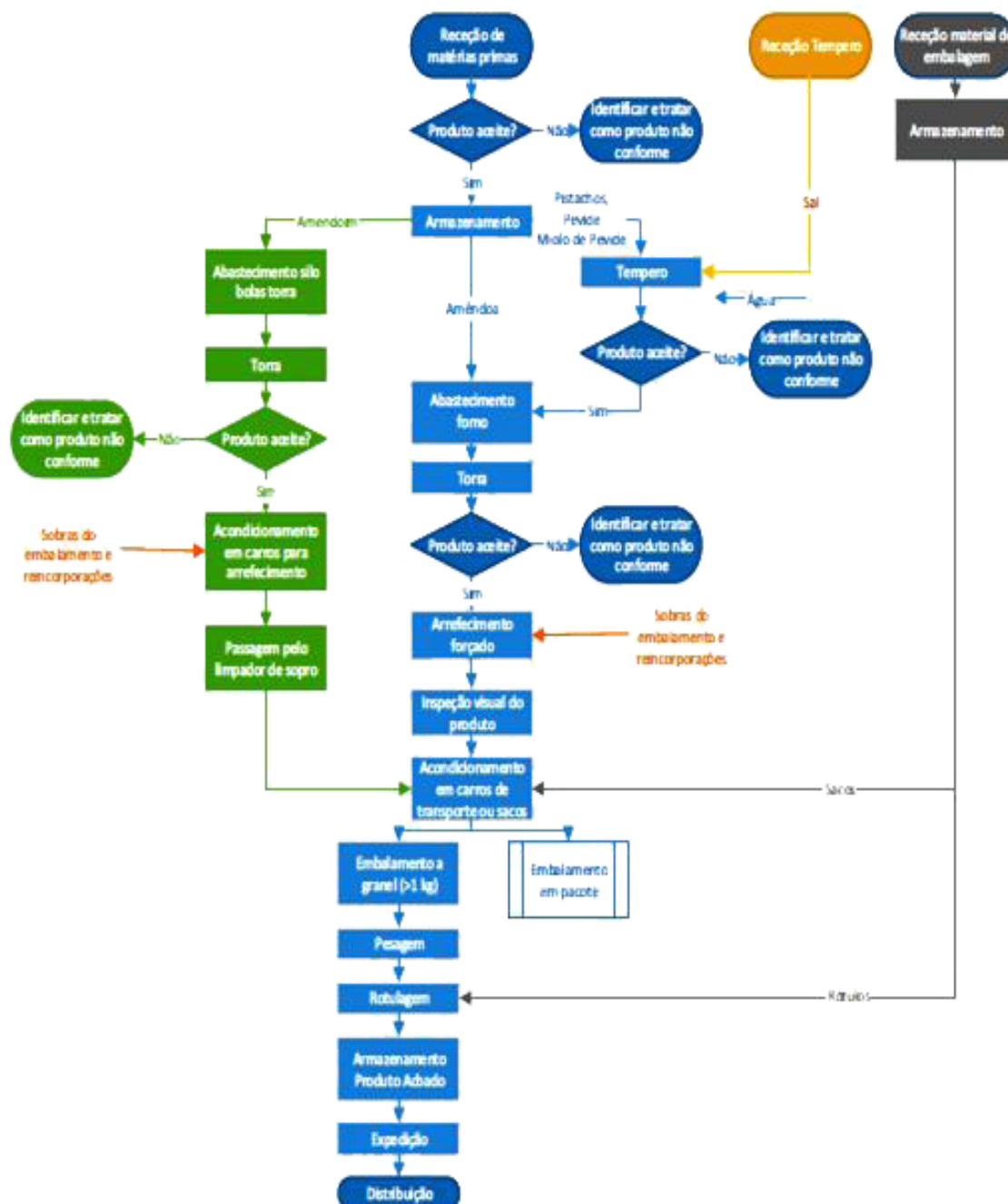


Figura 9 – Fluxograma da linha de produção para os produtos torrados.

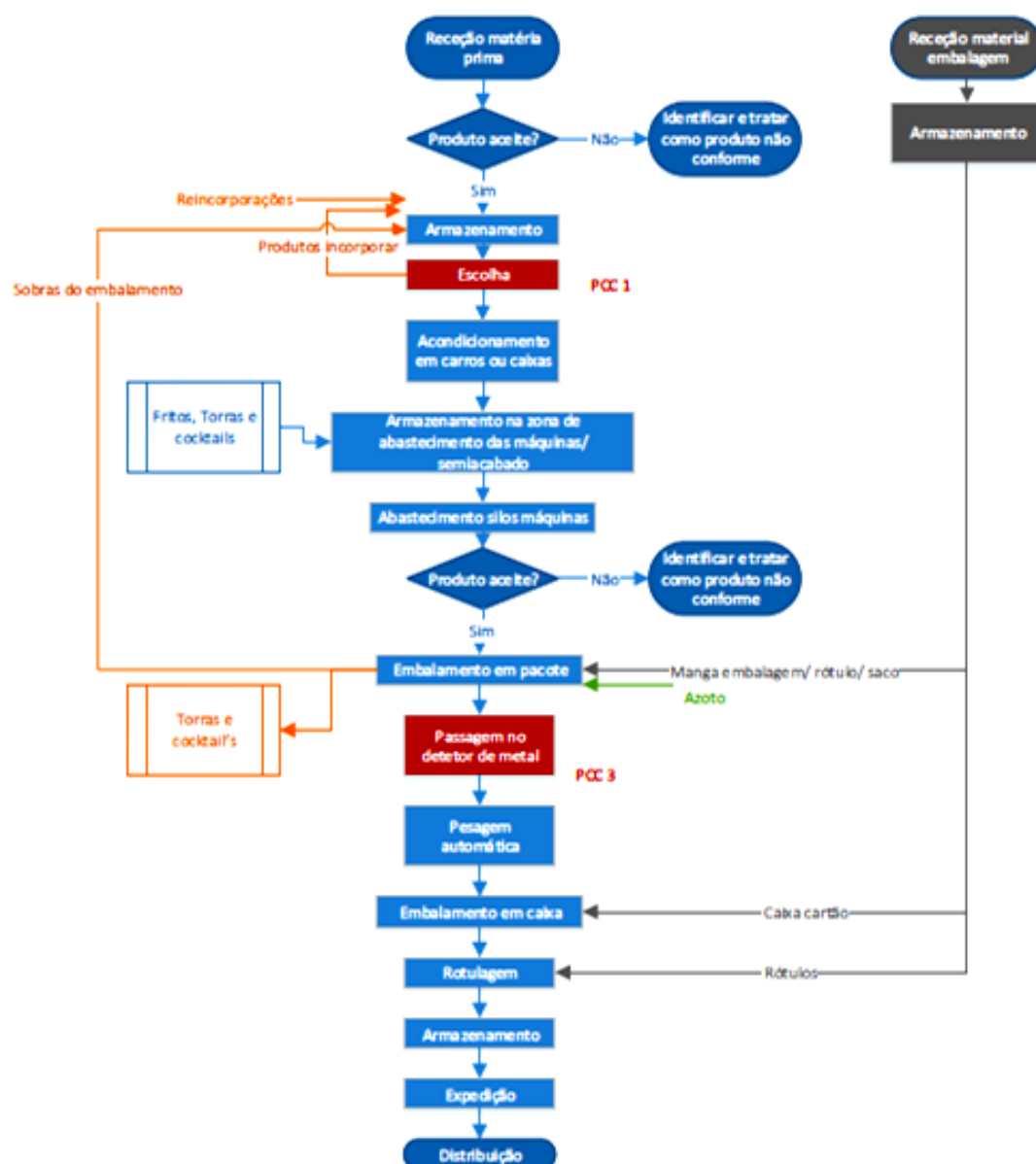


Figura 10 – Fluxograma da linha de produção para os produtos de escolha/embalados.

Os produtos que sofrem apenas escolha são aqueles que não são transformados, apenas inspecionados visualmente para eliminar qualquer perigo físico. São eles a avelã, a amêndoa não transformada, passas de uva, sultanas, corintos, miolo de noz, pinhão, farinha de amêndoa e frutas desidratadas.

3. Fungos produtores de micotoxinas

Os fungos podem ser considerados omnipresentes na Natureza, sendo abundantes no solo, na água e na vegetação. Estes seres vivos pertencem ao reino *Fungi*, são organismos eucariotas, uni (leveduras e fungos inferiores flagelados, entre outros) ou multicelulares (cogumelos e fungos filamentosos, entre outros), quimioorganoheterotróficos (desprovidos de clorofila e portanto não realizam fotossíntese), obtendo os nutrientes de que necessitam por absorção. Os fungos filamentosos (também designados de bolores) são multicelulares, caracterizando-se pela formação de estruturas vegetativas filamentosas denominadas de hifas (filamentos tubulares), que formam o micélio. Existem dois grandes tipos de hifas: septadas, com células capazes de comunicarem entre si através de poros da parede celular, e não septadas (cenocíticas), encontrando-se os núcleos dispersos ao longo da hifa.

Aquando de um processo de contaminação alimentar, o micélio tem dupla função. Por um lado, ajuda na fixação do bolor ao alimento, e por outro promove a reprodução pela presença de esporângios produtores de esporos (sexuados ou assexuados). É através do micélio que as colônias dos fungos são caracterizadas (pelo aspeto, cor, morfologia ou textura, entre outras) (Franco e Landgraf 1996). A seguinte imagem permite apresentar a estrutura de um fungo filamentoso.

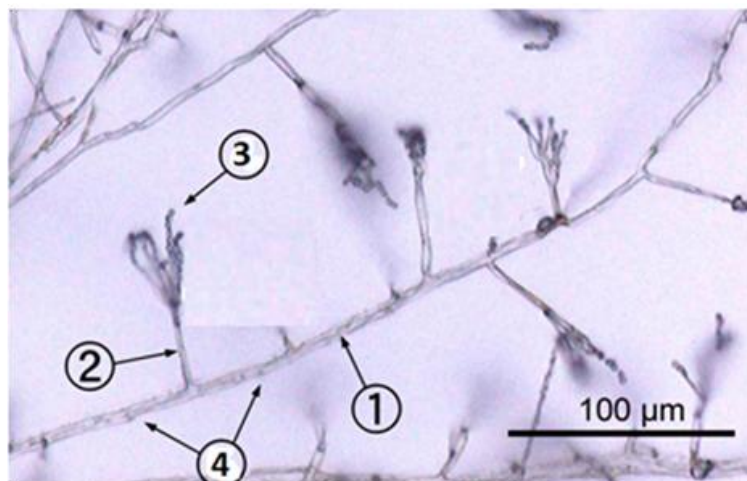


Figura 11 – Imagem ao microscópio de um fungo filamentoso. (Legenda: 1- Hifa, 2 - Esporângio, 3 - Esporos, 4 - Septos)

Os fungos produzem vários tipos de metabolitos secundários, alguns com propriedades antibióticas e outros com propriedades tóxicas. Os metabolitos secundários que demonstram ser tóxicos em animais são designados de micotoxinas. Estes compostos têm um papel importante na contaminação dos alimentos devido à sua elevada toxicidade nos seres humanos. Para além deste efeito, o crescimento de fungos num alimento, produz uma grande quantidade de enzimas extracelulares, que causam

alteração de sabor, perda de nutrientes, e conseqüentemente da qualidade organoléptica do produto.

O crescimento destes microrganismos depende de fatores intrínsecos, como o estado fisiológico e o metabolismo do fungo, e de fatores extrínsecos, como o tipo e disponibilidade de substrato, atividade da água, temperatura, pH do meio, pressão osmótica, entre outros (Jay 2005). Deste modo, o tipo e a quantidade de nutrientes disponível no alimento é um fator importante para o crescimento dos bolores. Sendo organismos quimioorganotróficos, a sua fonte de energia são compostos orgânicos como hidratos de carbono, álcoois e aminoácidos, entre outros. Desta forma, alimentos ricos em hidratos de carbono, favorecem o crescimento dos fungos. Ao nível do controlo dos fatores extrínsecos, na indústria alimentar, a atividade da água (a_w) e a temperatura são dois fatores muito importantes aquando da etapa de armazenamento, uma vez que se não forem mantidos nos níveis desejáveis podem induzir o crescimento de bolores e a produção de micotoxinas (Pardo 2004). Substratos com a_w abaixo de 0,60 representam um perigo relativamente baixo em relação à contaminação microbiana (à exceção de bolores xerófilos e leveduras osmofílicas), porém, a partir desse valor existe um aumento de proliferação de microrganismos, principalmente bactérias e fungos. Refira-se quinda que outro dos fatores extrínsecos determinante na taxa de crescimento dos fungos nos alimentos é a temperatura (Dhingra e Coelho 1998).

Relativamente à produção de micotoxinas, a atividade de água necessária é normalmente maior do que a requerida para o simples crescimento dos fungos. É ainda importante salientar que a ausência de fungos no alimento, no momento da sua colheita ou na linha de produção, não significa a ausência de micotoxinas. Tal pode acontecer devido à alteração das condições que levaram ao desenvolvimento do fungo, podendo no entanto as micotoxinas previamente produzidas continuarem presentes no alimento (Rodrigues, et al. 2009).

3.1. Bolores e leveduras

Tanto as leveduras como os bolores são fungos que se apresentam sob forma variada, desde esférica a ovoide no caso das leveduras, e filamentosa no caso dos bolores. Existem ainda fungos capazes de alternar sob estas duas formas, designados de fungos dimórficos, assumindo normalmente uma forma de levedura (unicelular) quando parasitários de outra espécie e uma forma de bolor (multicelular) quando saprófitas no seu ambiente natural.

As leveduras por serem células simples tendem a multiplicar-se mais rapidamente que os bolores, sendo a sua reprodução assexuada, através de um processo designado de gemulação, ou sexuada através da plasmogamia de células haploides. Ao nível da indústria alimentar, as leveduras podem ter aspetos negativos como positivos. Por

exemplo, as leveduras são essenciais no fabrico de pão e bebidas alcoólicas, assim como em praticamente todos os processos alimentares com fermentação alcoólica.

Os bolores apresentam uma morfologia cilíndrica e são formados por filamentos chamados hifas, tornando-se visíveis quando as hifas formam um micélio de tamanho macroscópico. Em alguns casos, podem produzir substâncias tóxicas. Tal como as leveduras, ao nível da indústria alimentar, estes apresentam prós e contras. Por um lado são usados na produção de alguns queijos e bebidas (saké, entre outras), sendo ainda largamente utilizados para a produção de antibióticos na indústria farmacêutica. Por outro lado, tal como as leveduras, podem ser responsáveis pela deterioração e contaminação de alguns produtos alimentares, e nos casos mais graves, levar à formação de micotoxinas. Na figura seguinte é possível comparar a aparência de um bolor e de uma levedura.



Figura 12 – Contaminação por um bolor.



Figura 13 – Levedura *Saccharomyces cerevisiae* observada ao microscópico eletrónico.

Seguidamente são apresentados dois dos bolores mais importantes ao nível da produção de micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxinas e patulinas, entre outras) na indústria alimentar, nomeadamente os géneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Estes dois géneros pertencem ao grupo dos ascomicetos que se caracterizam pela produção de esporos assexuados, designados de conídios, e também de esporos sexuados haploides (ascósporos) endogenamente em sacos designados de ascos. A produção de conídios, em cadeia simples ou ramificada, é efetuada por fiálides (células conidiogénicas dos fungos ascomicetes).

3.2. *Aspergillus*

O género *Aspergillus* é mesófilo e aeróbio, crescendo em ambientes ricos em oxigénio e com uma atividade ótima da água entre 0,78 e 0,87. Este género compreende mais de 260 espécies diferentes. Usualmente, o género *Aspergillus* pode ser identificado pelo seu micélio colorido e brilhante e pela presença de conídios (esporos assexuados). Para a identificação das diferentes espécies recorre-se a características morfológicas como o diâmetro do micélio produzido, produção de exsudatos e presença de pigmentos solúveis, entre outros (Klich 2002).

Na indústria alimentar o género *Aspergillus* é o fungo filamentosos com potencial para a produção de um maior número de substâncias cancerígenas, e nomeadamente de aflatoxinas, ocratoxina A e patulina. Entre as diversas espécies pertencentes a este género, a mais preocupante, em termos de segurança alimentar, é o *A. flavus*, contudo a sua identificação visual não é fácil por este ser muito semelhante a outras espécies como o *A. parasiticus* e *A. nomius* (Rodrigues, et al. 2007). O género *A. flavus* produz aflatoxinas a uma temperatura ótima de cerca de 35 °C, cessando a produção das mesmas a temperaturas abaixo dos 10 °C (Bullerman e Schroeder 1984). Os climas tropicais e quentes favorecem a proliferação dos fungos produtores de aflatoxinas. Na figura seguinte é apresentada uma imagem ao microscópio eletrónico da espécie *A. flavus*.



Figura 14 – Género *Aspergillus* (*A. flavus*) observado ao microscópio eletrônico.

3.3. *Penicillium*

O género *Penicillium*, tal como o género *Aspergillus*, produz conídios assexuados e esporos sexuados haploides em ascos. As características distintivas deste género baseiam-se no tipo de penicilli, isto é, na estrutura suportada pelo pedúnculo, sendo relevantes a forma e o tamanho das fiáldes, além da cor, tamanho e forma dos conídios. As suas colónias são de crescimento rápido e apresentam textura filamentosa. A temperaturas entre 25 °C e 27 °C, e a uma humidade superior a 80%, o género *Penicillium* apresenta condições ótimas de crescimento (Pitt 2000) Este género não é capaz de produzir aflatoxinas, mas pode produzir ocratoxina A e patulina, entre outras toxinas. De referir ainda que algumas espécies deste género têm particular interesse na saúde, nomeadamente na produção do antibiótico penicilina. Na figura seguinte é apresentada uma imagem ao microscópio ótico do género *Penicillium*.



Figura 15 – Género *Penicillium* observado ao microscópio ótico (após coloração).

4. Micotoxinas

A contaminação dos produtos alimentares por micotoxinas é um problema mundial que desperta grande preocupação se não forem cumpridas as boas práticas agrícolas e de produção. Segundo Abramson (1998), uma micotoxina é definida como um metabolito secundário, produzido naturalmente por diversos fungos filamentosos (bolors) em produtos de origem agrícola e que demonstram ser tóxicos quando ingeridos. Quimicamente, as micotoxinas são compostos químicos de baixo peso molecular, sendo agrupadas de acordo com o grau e tipo de toxicidade. São produzidas no final da fase exponencial de crescimento (fase caracterizada pelo elevado crescimento da população) ou início da fase estacionária (fase na qual o tamanho da população permanece constante), constituindo parte dos metabolitos secundários (Gimeno e Martins 2000). Estruturalmente são compostos policetónicos, produzidos aquando de uma redução incompleta dos grupos cetónicos na biossíntese dos ácidos gordos (Newman 2000).

Em termos da contaminação de um produto alimentar, a cultura em causa, e nomeadamente o substrato é o fator mais importante, a par do seu teor de humidade e da presença das espécies toxigénicas. Em geral, produtos como as oleaginosas (amendoim, pistachos, amêndoas, entre outras) e alimentos com alto teor de hidratos de carbono, e baixa atividade da água, são os mais favoráveis à contaminação por bolors e à produção de toxinas (Bennet e Klich 2003). De facto, algumas espécies do género *Aspergillus* são incapazes de produzir aflatoxinas em substratos com baixo teor de hidratos de carbono, mas capazes de as produzir em alimentos com teores elevados (Park e Bullerman 1983). Segundo (Silva 2008), o teor de água presente num alimento, que impacta diretamente na atividade da água disponível, é considerado também um dos fatores mais importante para a contaminação dos alimentos, nomeadamente no que concerne à sua deterioração.

Sabe-se ainda que, o efeito do clima como as ondas de calor, precipitação ou seca, nas regiões de onde provêm os produtos alimentares também podem impactar no crescimento dos fungos contaminantes e na produção de micotoxinas. Assim, e tal como é visível na figura seguinte, para ocorrer a produção de micotoxinas a associação de condições como a presença de estirpes toxigénicas, culturas suscetíveis e fatores ambientais são essenciais.

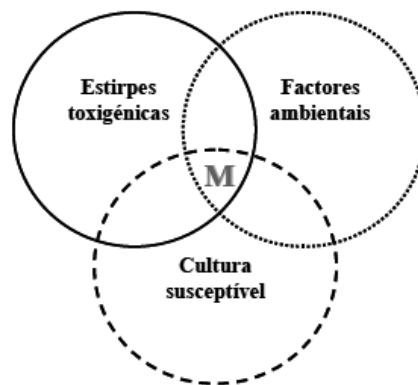


Figura 16 – Conjunto de fatores necessários para a produção de micotoxinas (M) num alimento.

As micotoxinas podem surgir nos alimentos, antes ou após o seu processamento, sendo que, quando surgem após o processamento é, por norma, devido a más práticas, ou condições higiénicas, dos operadores ou a condições de armazenamento favoráveis ao desenvolvimento dos bolores contaminantes. É ainda importante referir que um alimento, no qual tenha existido o crescimento de um fungo filamentososo não tem que possuir, necessariamente, toxinas. De facto, nem todos os fungos filamentosos são produtores de toxinas, e os que o são necessitam de condições adequadas para as produzirem. Por outro lado, após o crescimento de um fungo num alimento, com produção de toxinas, mesmo que o fungo já não se encontre presente aquando da colheita, ou seja posteriormente destruído, as micotoxinas podem permanecer ainda no alimento. Ademais, estas moléculas são quimicamente estáveis e de difícil degradação, não sendo degradadas durante o processamento de rações, e algumas são mesmo consideradas termorresistentes, isto é, mesmo após um processamento térmico as toxinas não são destruídas, permanecendo desta forma ativas (Hocking, et al. 2006).

Existe uma grande variedade de micotoxinas conhecidas, e sendo que, segundo Adegoke (2004), cerca de 300 micotoxinas foram já isoladas e caracterizadas. No entanto apenas algumas são encontradas nos alimentos em quantidades perigosas para a saúde humana, sendo alvo de regulação própria na legislação (Bennet e Klich 2003). Nos subcapítulos seguintes são apresentados, individualmente, os tipos de micotoxinas mais relevantes para este trabalho.

4.1 Aflatoxinas

De entre todas as micotoxinas, as aflatoxinas são as mais estudadas mundialmente. Sabe-se que estas toxinas possuem a capacidade de se ligarem ao DNA das células, afetando a síntese proteica e provocando deficiências imunitárias. Nos seres humanos, o fígado é o principal órgão afetado (Neal e Coker 2000). Existem quatro tipos principais de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂), distinguidas pela sua fluorescência em luz

ultravioleta (B-Blue e G-Green), sendo que a soma das aflatoxinas B₂, G₁ e G₂ é geralmente menor que a B₁ em frutos secos. Entre as aflatoxinas, a mais tóxica é a aflatoxina B₁, considerada a mais carcinogénica de acordo com a *Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro* (IARC). De acordo com (Hussein e Brasel 2001) a toxicidade das aflatoxinas G₁, B₂ e G₂ é, respetivamente, 50%, 80% e 90% menor que a da B₁. A toxicidade das aflatoxinas é devida a uma ligação dupla no seu anel, considerado o centro ativo da molécula, e responsável pela sua fluorescência (Abrar, et al. 2013). Ao nível do ser humano, a aflatoxina B₁ (AFB₁) é rapidamente absorvida pelo sistema gastrointestinal, o que facilita a sua circulação na corrente sanguínea.

Os fungos filamentosos produtores de aflatoxinas pertencem ao género *Aspergillus*, sendo as aflatoxinas B₁ e B₂ produzidas por *A. flavus* e *A. parasiticus*, e as aflatoxinas G₁ e G₂ produzidas por *A. parasiticus* (Rodrigues, et al. 2009). Recentemente a espécie *A. nomius* também se tem mostrado produtora de aflatoxinas B₁ e B₂ (Pererson, et al. 2001). Em condições ambientais adequadas a sua produção nos alimentos é rápida, nomeadamente em condições de chuva e orvalho em períodos quentes. Desta forma, podem ser encontradas em alimentos de regiões com temperatura e humidade elevadas (Jay 1997). Em alimentos que contenham como substrato a glucose, sacarose e maltose a formação de aflatoxinas é mais elevada, pelo que estas toxinas se encontram sobretudo presentes em amendoins, milho, frutos secos, oleaginosas e cereais. De notar que, apesar da sua perigosidade, estas toxinas não alteram as propriedades organolépticas do produto alimentar (sabor, odor, etc.). Já a aflatoxina M₁, um derivado metabólico da AFB₁ (após hidroxilação) é normalmente encontrada no leite e nos seus derivados, e ainda na carne em menor quantidade (Dinis 2002).

A seguinte imagem apresenta as fórmulas químicas dos quatro principais tipos de aflatoxinas.

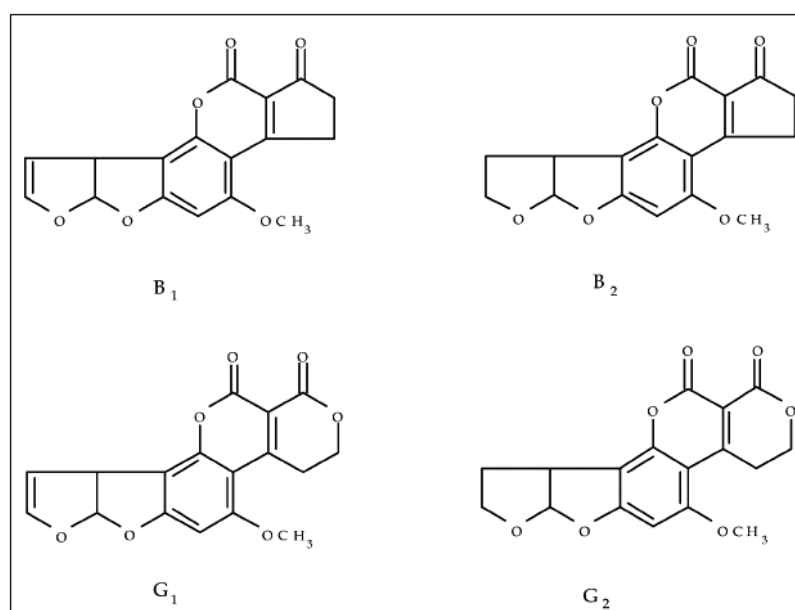


Figura 17 – Estrutura química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

Diversos estudos já publicados demonstraram já o efeito que um processo térmico pode ter sobre as aflatoxinas presentes em frutos secos e oleaginosas. Assim, Hussain et al (2011) refere que as aflatoxinas B1 e B2 presentes em amendoins inteiros podem ser quase totalmente (95%) destruídas num processo térmico a 150 °C durante 120 minutos. Já Bullerman et al (2007) refere uma redução de 63% em pistachos, para o mesmo processo térmico. Mesmo quando este tipo de processos é efetuado a temperaturas mais baixas ou tempos mais curtos, pode existir ainda uma redução significativa das aflatoxinas. Este facto é atestado por Ogunsanwo et al (2004), entre outros, que obteve uma redução de 70% para a AFB1, e 80% para a AFG1, em amendoins processados a 150 °C durante 30 minutos.

4.2 Ocratoxina A

Dentro do grupo das ocratoxinas, as principais englobam a ocratoxina A, também designada de OTA, ocratoxina B e ocratoxina C, sendo a mais estudada a ocratoxina A pela sua elevada toxicidade (Scussel 1998). Esta ocratoxina pode encontrar-se em todos os animais, com particular perigosidade nos seres humanos (com particular incidência nos rins), devido ao elevado tempo de vida até à sua eliminação (Creppy 1999).

A OTA emite uma fluorescência verde azulada, sob radiação ultravioleta (UV). A fórmula molecular da OTA é $C_{20}H_{18}ClNO_6$, sendo descrita como uma dihidroisocumarina ligada, por uma ligação amida, entre o seu grupo 7-carboxilo e a L-β-fenilalanina (Abarca, et al. 2001). A sua temperatura de decomposição é de cerca de 169 °C, e a sua toxicidade é devida, fundamentalmente, ao *stress* oxidativo associado à produção de radicais de oxigénio (Khoury e Atoui 2010). A figura seguinte apresenta a fórmula química da ocratoxina A.

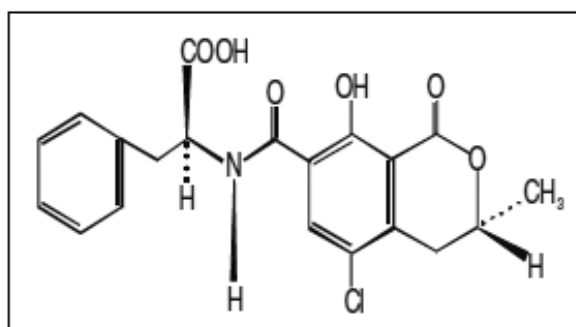


Figura 18 – Estrutura química da ocratoxina A (Khoury e Atoui 2010)

A ocratoxina A é produzida essencialmente por fungos dos géneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Em climas mais temperados esta micotoxina é produzida pelo género *Penicillium*, enquanto que em regiões mais quentes é produzida pelo género *Aspergillus* (Bennet e Klich 2003) (Frisvad, et al. 2007). Os principais produtos

alimentares que podem conter estas toxinas englobam uvas, passas, sultanas e figos, entre outros, sendo sobretudo encontradas em produtos com origem na Europa e América do Norte (Creppy 2002).

Sabe-se que a redução da ocratoxina depende do tempo e da temperatura utilizada nos processos de torração. De facto, em estudos publicados sobre a destruição da ocratoxina A por processos térmicos, Bullerman et al (2007) refere uma redução que pode chegar aos 93% nos processos de torra de grãos de café. Já segundo Taniwaki (2007) pode ocorrer uma redução de 87% desta toxina quando sujeita a uma temperatura de 220 °C durante 12 minutos. O mesmo estudo aponta que para a mesma temperatura, a torra dos grãos de café durante 5 minutos permite uma redução de apenas 46%.

4.3 Outras micotoxinas não estudadas no presente trabalho

Além das micotoxinas abordadas anteriormente, existem outras que suscitam interesse na indústria alimentar, embora não tão preocupantes como as anteriores, e que se encontram sumariamente descritas de seguida.

4.3.1 Zearalenona

Os principais bolores produtores de zearalenona pertencem ao género *Fusarium*, ocorrendo com frequência nos cereais de todo o mundo (O'Donnell, et al. 2004). A zearalenona ocorre em simultâneo com o desoxinivalenol, embora em menores quantidades (Krska, et al. 2003), fluorescendo de cor azul esverdeada sob luz UV. A ação da zearalenona sobre os seres humanos encontra-se descrita como causando infertilidade e abortos. Em relação aos principais produtos alimentares em que pode ser encontrada, realçam-se o milho, a aveia e o trigo (Bennet e Klich 2003).

4.3.2 Patulina

A patulina é uma toxina produzida por um grande número de espécies do género *Penicillium*, e por algumas espécies do género *Aspergillus*. Esta micotoxina pode ser produzida a temperaturas que variam entre 25 °C até temperaturas de refrigeração, e sob luz ultravioleta, fluoresce de cor vermelho tijolo escuro (Ellen 1997). A patulina é encontrada principalmente em maçãs, mas pode também ser encontrada noutras frutas, cereais e pães, entre outros alimentos.

4.3.3 Fumonisina

Existem vários tipos desta micotoxina (B₁, B₂ e B₃), sendo o mais importante, ao nível da indústria alimentar, a fumonisina B₁. Este tipo de toxinas é hidrossolúvel e por isso o seu estudo é mais dificultado do que em outras toxinas (Bezuidenhout, et al. 1988), contudo pensa-se que possui ação carcinogénica. Os principais fungos produtores desta toxina pertencem ao género *Fusarium*, sendo a sua temperatura ótima de crescimento de 30 °C, a atividades de água superiores a 0,90 (Magan e Olsen 2004). Ao contrário de outros fungos, estes não predominam na fase de armazenamento, estando associadas a contaminações na pré-colheita, sendo o milho o principal alimento afetado.

4.3.4 Desoxinivalenol

Esta micotoxina, também denominada de vomitoxina, ou abreviadamente DON, pertence à família dos tricotecenos, sendo constituída por cerca de 200 metabolitos diferentes produzidos pelo género *Fusarium*. Estas toxinas encontram-se divididas em 4 grupos (A a D), sendo que no grupo A se encontram as toxinas de maior toxicidade, como a fusariotoxina T₂ e a hidrotóxina HT₂ (Gilbert e Enyuva 2008). A contaminação de produtos alimentares como o milho, a aveia e o trigo, por este fungo dá-se, sobretudo a em baixas temperaturas e elevada humidade, sendo a temperatura ótima para a produção desta toxina de 25 °C.

Outras micotoxinas também que também podem aparecer nos alimentos englobam a citrina, o ácido penicílico, a esterigmatocistina e o ácido fusárico. Contudo, possuem uma importância mais reduzida ao nível da indústria alimentar. A figura seguinte permite mostrar a evolução do estudo das diferentes micotoxinas ao longo dos anos, enfatizando a sua relevância na indústria alimentar.

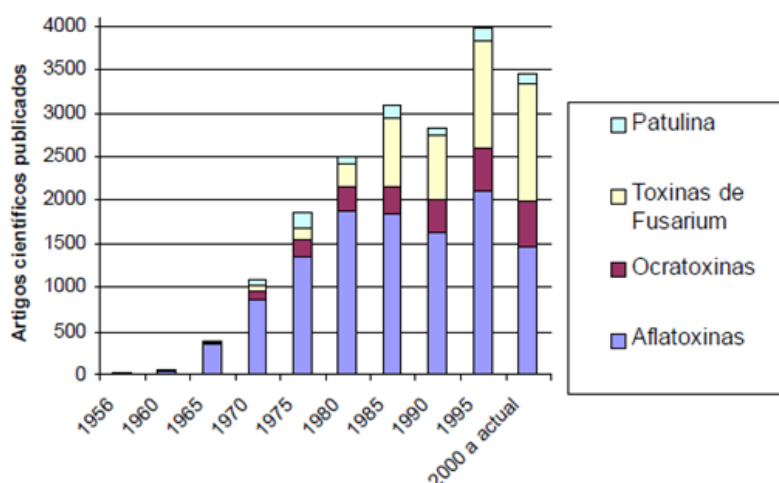


Figura 19 – Artigos publicados desde meados da década de 90 até finais de 2004 sobre as micotoxinas mais investigadas.

Dada a ocorrência deste conjunto de micotoxinas numa gama abrangente de produtos alimentares, e do seu efeito na saúde humana, foi adotada regulamentação adequada de forma a estabelecer barreiras à comercialização de produtos contaminados acima de certos valores. Desta forma, a União Europeia, com o objetivo de controlar a exposição da população a estes contaminantes, estabeleceu os limites máximos toleráveis para a presença de micotoxinas em diversos tipos de alimentos. Saliente-se que estes limites foram definidos tendo em conta estimativas da ingestão diária efetuada pela população, em estudos do *Scientific Committee on Food* (1998). A seguinte tabela apresenta, de uma forma resumida, os fungos produtores das principais micotoxinas, os alimentos onde maioritariamente se encontram, e os respetivos limites máximos toleráveis.

Tabela 1 – Principais micotoxinas e limites máximos toleráveis ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ ou ppb) segundo os Regulamentos (CE) N° 1881/2006, N° 629/2008 e N° 165/2010.

Micotoxinas	Fungos produtores	Géneros alimentícios	Limites máximos ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Aflatoxinas B ₂ , G ₁ , G ₂	<i>A. flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i>	Amendoins, frutos de casca rija, cereais, milho	4
Aflatoxina B ₁			2
Aflatoxinas B ₂ , G ₁ , G ₂	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. alutaceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>P. verrucosum</i>	Amêndoas	10
Aflatoxina B ₁			8
Ocratoxina A	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. alutaceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>P. verrucosum</i>	Passas de uvas, sultanas, café	10
Patulina	<i>P. viridicatum</i> , <i>A. clavatus</i>	Sumos de frutas	50
		Alimentos para bebés	10
Fumonisina	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Alimentos à base de milho	400
Zearalenona	<i>F. graminearum</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. culmorum</i>	Cereais	100
		Milho	200
		Pão	50
Desoxinivalenol	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Cereais, massas	750
		Pão	500

5. Principais alimentos analisados

De toda a variedade de produtos alimentares comercializados pela *Frutorra Pimenta, Lda.* apenas alguns os produtos mais suscetíveis de contaminação por micotoxinas foram analisados: amendoim, amêndoa, pistacho, sultana/passa de uva/corintos e caju.

5.1 Propriedades dos alimentos estudados

5.1.1 Sultanas/Passa de uva/corintos

A secagem da uva é usada quando se pretende obter passas de uvas e sultanas, sendo que a principal diferença entre estes dois produtos deriva do maior tamanho das sultanas. Estes produtos, após secos, possuem uma composição que pode variar entre 65 a 79% (com um valor médio de 74%) de hidratos de carbono, 3% de proteínas, 0,8% de lípidos e 22% de água. A contaminação destes produtos alimentares verifica-se, sobretudo, no decorrer do processo de maturação da uva, nomeadamente por fungos ocratoxigénicos (Mendonça, et al. 2013). Contudo, durante o processo de secagem e em etapas posteriores, pode ocorrer o ataque de pragas, e a proliferação de fungos, aumentando a probabilidade de síntese de micotoxinas, e em especial de ocratoxinas (Nogueira e Oliveira 2006). Em termos da sua proveniência, as sultanas, passas de uvas e corintos analisados provêm maioritariamente da África do sul, Turquia, China e Irão.

5.1.2 Amendoim

O amendoim é uma leguminosa que pode ser consumida das mais variadas formas, desde cozido, torrado a frito, entre outros, sendo considerado uma fonte de nutrientes, calorias, minerais e vitaminas essenciais à saúde. Ao nível da sua produção, se a colheita do amendoim for efetuada tardiamente pode provocar a germinação no interior desta oleaginosa, tornando-a exposta ao ataque por fungos. Mais, um elevado índice de pluviosidade, acompanhado de altas temperaturas, aumenta significativamente a probabilidade de contaminação com produção de micotoxinas (Dorner 2005). Após colheita são secos durante 2 a 3 dias e seguidamente armazenados. Após este processo, o amendoim deverá ter na sua composição cerca de 22% de hidratos de carbono, principalmente amido, 50% de lípidos, 24% de proteínas e 2% de água (Settaluri, et al. 2012). Em termos da sua proveniência, o amendoim analisado provêm maioritariamente da China, Brasil, Espanha, Argentina e Estados Unidos da América.

5.1.3 Amêndoa

A amêndoa é uma oleaginosa que cresce dentro de uma casca rígida de uma árvore designada de amendoeira. A sua colheita ocorre nos meses de maior calor. Por outro lado, nos meses em que se observa um aumento de humidade no ar, devido a índices de pluviosidades elevados, a amêndoa fica sujeita ao ataque de fungos, sobretudo *Aspergillus* (Ribeiro e Coixão 2011). A sua composição é de cerca de 21% de hidratos

de carbono, 21% de proteínas, 51% de lípidos e 5% de água. Após a colheita, as amêndoas são expostas ao Sol para secarem durante cerca de 10 dias e posteriormente armazenadas. Em termos da sua proveniência, a amêndoa analisada provém maioritariamente dos Estados Unidos da América e de Espanha.

5.1.4 Caju

A castanha de caju é um fruto que cresce dentro de uma concha, contendo óleo fenólico não comestível, em árvores, designadas de cajueiros, principalmente do Brasil, da Índia e do Vietname. A sua composição é de cerca de 24% de hidratos de carbono, 23% de proteínas, 43% de lípidos, 5% de água e ainda sais fósforo, cobre e magnésio. O tempo de maturidade destes frutos varia entre 2 a 3 meses e, após a colheita, são secos ao Sol e posteriormente armazenados. Segundo Bellaver (2004), alguns produtores fazem uso da colheita tardia para reduzir a humidade do grão, contudo a incidência de pragas, nesses casos, aumenta consideravelmente. Em termos da sua proveniência, o caju analisado provém maioritariamente da Índia e do Vietname.

5.1.5 Pistacho

Os pistachos crescem em árvores formando cachos, como se fossem uvas, cercados por uma casca rígida. Estes alimentos são constituídos por 27% de hidratos de carbono, 20% de proteínas, 46% de lípidos e 7% de água. Na altura da colheita, os pistachos possuem uma elevada taxa de respiração, necessitando ser secos previamente ao seu armazenamento. Em termos da sua proveniência, o pistacho analisado provém maioritariamente da Espanha, Irão e Estados Unidos da América.

Nota: Todos os valores nutricionais apresentados anteriormente resultaram de análises efetuadas no laboratório da *Controlvet Segurança Alimentar SA*, ao abrigo de contrato estabelecido com a empresa *Frutorra Pimenta, Lda*.

6. Métodos de análise implementados na *Frutorra Pimenta*

Os perigos biológicos associados a produtos alimentares estão muitas vezes associados ao desrespeito das boas práticas de fabrico, na produção, colheita e processamento destes produtos, assim como numa deficiente prática higiénica na sua manipulação por parte dos manipuladores de alimentos. Deste modo, é de crucial importância a monitorização de possíveis contaminantes alimentares, físicos, químicos, microbiológicos, enzimáticos e de toxinas.

Neste contexto, uma elevada abrangência de fatores devem ser considerados na seleção dos métodos para a deteção de contaminante, e no presente caso, de micotoxinas. Entre estes estão incluídos fatores económicos, de sensibilidade, rapidez e especificidade, entre outros. Tradicionalmente, os métodos analíticos convencionais, para a determinação e quantificação de micotoxinas, incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC). No entanto, o seu extenso procedimento de preparação das amostras, e o custo envolvido, limitam a sua aplicação prática. Assim, os ensaios rápidos para a determinação dos contaminantes encontram-se, cada vez mais, a serem utilizados nas indústrias alimentares, por serem de baixo custo, simples, rápidos e confiáveis. Ademais, no caso da quantificação das micotoxinas presentes em alimentos, o uso destes testes rápidos tem ganho uma elevada relevância ultimamente.

No subcapítulo seguinte é apresentado o método implementado na instalação industrial da *Frutorra Pimenta, Lda.* para o estudo da contaminação dos produtos alimentares comercializados por micotoxinas.

6.1 Definições importantes e componentes do método ELISA

Para compreender melhor o método ELISA utilizado é necessário entender alguns conceitos básicos, que se encontram seguidamente descritos.

- **Anticorpo:** É uma proteína (por norma uma glicoproteína) produzida por células de plasma dos vertebrados contra estruturas que são reconhecidas como estranhas ao corpo (antigenes). Os anticorpos ligam-se aos antigenes por ligações eletrostáticas, hidrofóbicas, pontes de hidrogênio ou forças de Van der Waals. A interação entre um anticorpo e o seu antigene é seletiva e específica.
- **Analito:** É a substância presente numa amostra que se pretende analisar. No caso presente do método ELISA empregue os analitos são as micotoxinas a serem determinadas.

- Enzima: É uma molécula, normalmente proteica, que atua como um catalisador, aumentando a velocidade de uma reação específica. No caso presente, foram utilizadas essencialmente peroxidases.
- Substrato (enzimático): É um composto químico que é modificado por uma enzima. Por norma, a reação enzimática transforma o substrato num produto que atuará como um sinal da quantidade de substrato transformado. No caso presente os substratos utilizados foram essencialmente peróxido de hidrogénio-ureia, e o sinal emitido foi uma alteração da cor de um cromogénio (essencialmente tetrametilbenzidina) em solução.
- Conjugado: O complexo formado por anticorpos, analitos ou análogos de analitos ligados a uma enzima são chamados de conjugados. No caso presente, o conjugado reporta-se essencialmente ao complexo toxina-enzima(peroxidase).
- Placa de microtitulação: São placas de poliestireno ativado por radiação β ou γ que podem conter 96 ou 48 poços. Na superfície ativada de cada poço encontra-se ligado o anticorpo ou o antígeno (dependente da metodologia utilizada).
- Solução Stop: Solução utilizada para terminar a reação do substrato, provocando, no presente caso, a alteração da cor da solução de azul para amarelo, permanecendo estável até à medição.
- Leitor de placas de microtitulação: Equipamento que permite quantificar a intensidade da luz que atravessa a placa de microtitulação, a um determinado comprimento de onda. O resultado é apresentado em unidades de absorvância.

6.2 Método ELISA

Um dos métodos rápidos mais utilizados para a quantificação de micotoxinas, baseado no uso de anticorpos, é o teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) que se aprovou como método oficial da AOAC – *Association of Official Analytical Chemists* (Scott e Lawrence 1992). Os testes ELISA são ensaios imunoenzimáticos, nos quais o princípio básico reside na utilização de anticorpos, analitos (antígenos, micotoxinas, etc.) ou análogos dos analitos ligados a enzimas para amplificação do sinal detetado. De facto, o uso de enzimas neste tipo de testes permite catalisar a reação de uma dada espécie química de modo a esta dar origem a um produto com uma cor diferente, medida por espectrofotometria ou por colorimetria. Esta metodologia permite a deteção de micotoxinas em vários alimentos, desde oleaginosas a cereais, leite e carnes, entre outros.

Existem vários tipos de testes ELISA: direto, indireto, *sandwich*, competitivo e não competitivo. O método mais utilizado é o teste ELISA competitivo, no qual um análogo do analito, ou um analito marcado, compete diretamente com o analito a quantificar pela ligação a um anticorpo. Neste caso, os poços das placas de microtitulação do *kit* utilizado são revestidos por anticorpos específicos para o analito em causa, ou para um

anticorpo secundário. O papel dos anticorpos (de revestimento ou secundários, conforme o método) é capturar (ligar) as moléculas de analito presentes na amostra, os analitos marcados ou os seus análogos. No caso presente, os anticorpos utilizados são monoclonais, isto é, são produzidos em laboratórios a partir de um tipo de linfócito responsável pela resposta imunitária. Neste tipo de resposta, a imunoglobulina (*IgG*) é o principal anticorpo presente, auxiliando na neutralização de vírus e toxinas.

A preparação da amostra é essencial para a extração do analito (no presente caso, micotoxinas), fazendo uso de um solvente polar (solução de metanol no presente caso). Saliente-se ainda que, antes da extração da micotoxina com o solvente, a amostra tem de ser bem triturada e, após a extração, filtrada e submetida ao ensaio. Nesse sentido, o preparado da amostra é colocado nos poços da placa de microtitulação que contém os anticorpos de revestimento. Quando se adiciona o conjugado (complexo toxina-enzima) à amostra, juntamente com uma solução de um anticorpo secundário (para aflatoxinas no presente caso), existe uma competição entre a toxina livre (presente na amostra) e a toxina ligada à enzima, pela ligação aos anticorpos secundários. Estes, por sua vez, estabelecem uma ligação anticorpo-anticorpo com os anticorpos de revestimento. Posteriormente é necessária uma etapa de lavagem para remover os reagentes em excesso (não ligados aos anticorpos de revestimento).

A reação enzimática, que permite a quantificação do analito (micotoxina) presente, ocorre na última etapa do procedimento. Assim, após a etapa de lavagem, o conjugado toxina-enzima, ligado à placa através dos anticorpos aderidos, é revelado pela adição do substrato/cromogéneo específico da enzima e é catalisada uma mudança de cor. Uma vez que a intensidade da cor produzida é inversamente proporcional à concentração de toxinas na amostra (quanto maior a concentração de micotoxinas numa amostra, menor será a ligação entre o anticorpo e o conjugado micotoxina-enzima), menor será a intensidade da cor. Nesta etapa, a enzima é utilizada para converter o substrato, incolor, num produto solúvel colorido (azul no presente caso), sendo que, nos testes ELISA, as enzimas mais utilizadas são a catalase e a peroxidase (utilizada maioritariamente no presente caso). Por fim, a adição de uma solução *Stop*, que contém, no presente caso, ácido sulfúrico, interrompe a reação do substrato com a enzima mudando a coloração de azul para amarelo. Finalmente, o produto formado pode ser quantificado através da utilização de um espectrofotómetro, pela medição da intensidade da luz que atravessa a placa de microtitulação, a um determinado comprimento de onda.

O método ELISA encontra-se disponível em *kits* e permite quantificar micotoxinas quantitativa e qualitativamente (Zeng, et al. 2006). As vantagens do método ELISA passam por terem um procedimento simples de preparação da amostra e não exigirem equipamento especializado. Por outro lado, este método, apesar de ter limites de deteção comparáveis com os métodos cromatográficos, tem como desvantagem a possibilidade de apresentar falsos positivos e falsos negativos. De facto, os métodos rápidos aprovados oficialmente, os quais o método ELISA se insere, são utilizados apenas para

controle, uma vez que apesar de os resultados negativos obtidos poderem ser considerados como efetivamente negativos, os resultados positivos devem ser confirmados por métodos padrões (Feng 1995). Desta forma, este método é comumente utilizado como método de rastreio, sendo necessária a confirmação dos testes com resultado positivo, por outros métodos análise mais sensíveis e precisos de modo a avaliar mais rigorosamente os níveis de contaminação por micotoxinas.

A seguinte figura mostra todos os passos descritos anteriormente para melhor percepção do método ELISA competitivo utilizado.

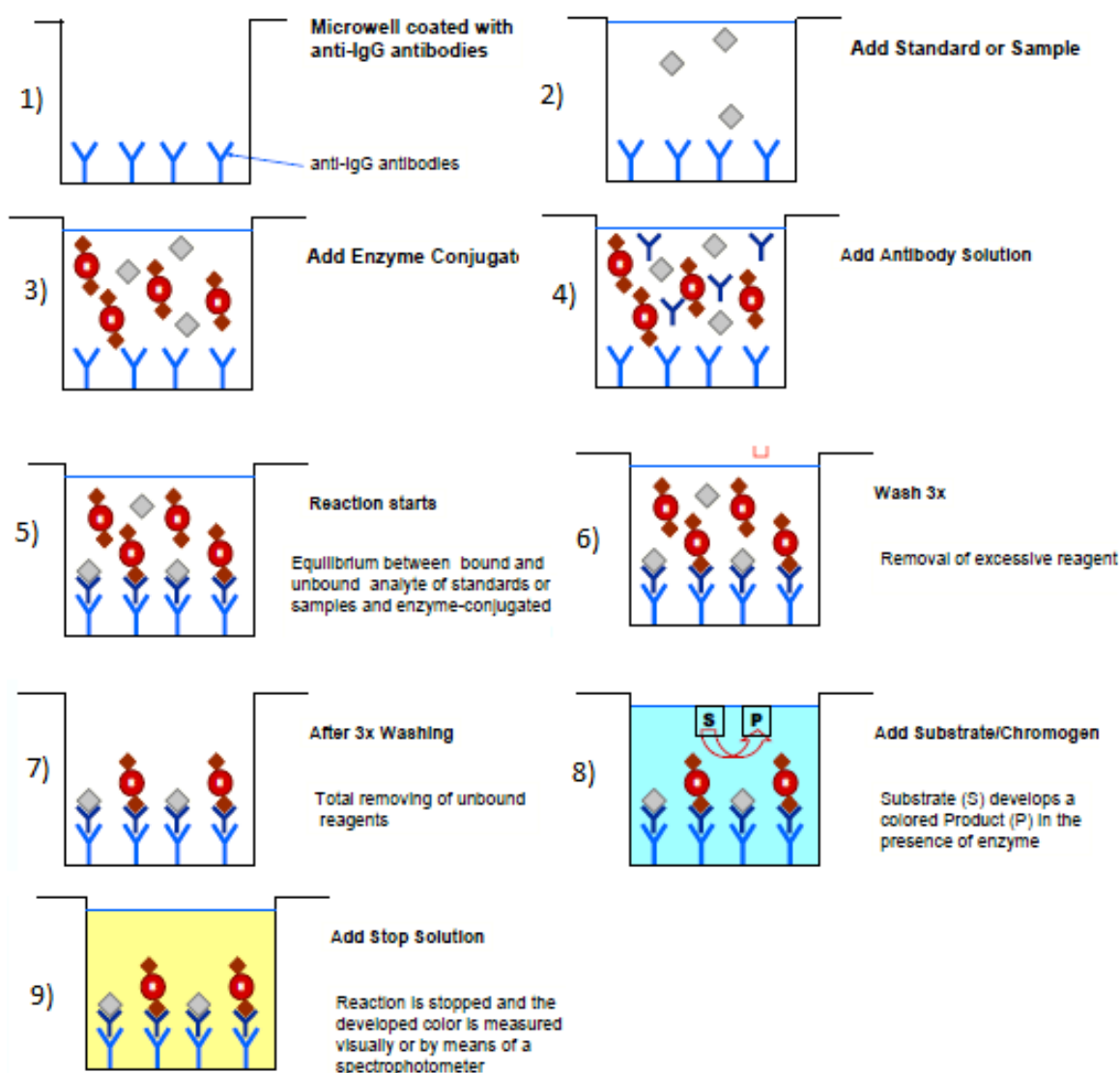


Figura 20 – Sequência de etapas num teste ELISA competitivo.

A metodologia implementada no laboratório da unidade industrial da *Frutorra Pimenta, Lda.* teve por base o leitor de placas de microtitulação *Stat Fax 4700* (*Awareness Technology, Inc., Palm City, USA*), de lâmpada de tungsténio e comprimentos de onda de 405 nm a 630 nm. As seguintes figuras representam o leitor de placas de

microtitulação utilizado em todos os testes, e o kit *Ridascreen* (*R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha*) utilizado para a análise das micotoxinas.



Figura 21 – Leitor *Stat Fax 4700* usado nas análises de micotoxinas.



Figura 22 – Kit *Ridascreen* para a determinação de micotoxinas.

6.3 Colunas de imunoafinidade

Para a determinação das concentrações de ocratoxina nas passas de uvas/sultanas, utilizaram-se colunas de imunoafinidade, pois estes produtos alimentares contêm um elevado número de substâncias, como os pigmentos, capazes de adulterar o resultado final. As colunas de imunoafinidade referem-se a colunas utilizadas para purificação de um analito (antigene, toxina, etc.) presente numa amostra, através do estabelecimento de

ligações entre o anticorpo e o analito a analisar, previamente à sua quantificação. Posteriormente o analito é libertado fazendo-se passar uma solução de extração capaz de quebrar as ligações entre o analito os anticorpos. Assim, as principais vantagens da utilização deste tipo de colunas passam por uma maior especificidade do método, uma vez que purificam a amostra, concentrando o analito, ser um método relativamente rápido e permitir altas percentagens de recuperação para a análise final (Bugno, et al. 2006).

As colunas de imunoafinidade utilizadas continham uma suspensão de gel (*sepharose-gel*) no qual os anticorpos (monoclonais e específicos para a ocratoxina, no presente caso) se encontravam ligados covalentemente. Este processo envolve um passo de adsorção do analito presente à coluna, pelo estabelecimento de ligações entre o analito e os anticorpos, e um passo subsequente de libertação do mesmo. Assim, após a passagem (eluição) da amostra pela coluna e retenção do analito pelos anticorpos presentes, utilizou-se uma solução de metanol (que desnatura os anticorpos) para a extração do analito (ocratoxinas, no presente caso). Esta técnica tem sido amplamente utilizada na indústria alimentar pois permite a extração, concentração e purificação das micotoxinas numa só etapa (Alcaide-Molina, et al. 2009).

Na seguinte figura encontra-se representado esquematicamente o funcionamento do método utilizado para a determinação das ocratoxinas envolvendo colunas de imunoafinidade.

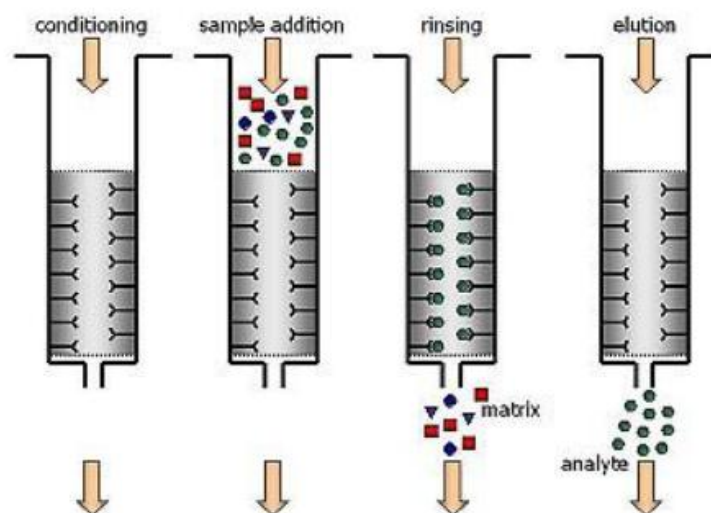


Figura 23 – Princípio base do método utilizando colunas de imunoafinidade.

A seguinte figura representa a coluna de imunoafinidade *Rida Ochratoxin A column* (*R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha*) utilizada na análise da ocratoxina A.



Figura 24 – Coluna de imunoafinidade *Rida Ochratoxin A column*.

7. Procedimento experimental e análise dos resultados

Neste capítulo é apresentado, numa primeira parte, o procedimento experimental dos vários testes realizados e numa segunda parte os resultados obtidos, assim como a sua análise crítica.

7.1 Procedimento experimental

Foram realizadas diversas atividades experimentais, correspondentes à determinação das aflatoxinas totais, da aflatoxina B₁ (analisada em separado quando necessário), e da ocratoxina A. Foi ainda avaliado o crescimento de bolores e leveduras de determinados alimentos. Todos os métodos analíticos utilizados para a determinação de micotoxinas foram compostos por 3 etapas fundamentais: a amostragem, a preparação da amostra (extração e limpeza) e a análise quantitativa.

De seguida encontra-se o procedimento experimental para cada tipo de análise.

7.1.1 Determinação de aflatoxinas

No processo de determinação de aflatoxinas, a amostragem deve ser a mais rigorosa possível para uma melhor representatividade, sendo, por isso, retiradas amostras (cerca de 200 g) de vários lotes diferentes. De seguida, a amostra foi triturada por uma picadora *Ufesa Pic&Roll (BSH Electrodomésticos España, S.A., Madrid, Espanha)* e misturada, para que a porção a analisar seja composta de pequenas frações dos vários locais de amostragem. Seguidamente adicionaram-se 5 g da amostra triturada a 25 mL de metanol a 70%. Agitou-se vigorosamente durante três minutos, para extração das micotoxinas, e filtrou-se através de um filtro *RS (Filtres Durieux, Torcy, França)*. Finalmente diluiu-se 1 mL de filtrado com 1 mL de água destilada.

Para a determinação das aflatoxinas totais utilizou-se o *kit RidascreenFast AflatoxinSC (R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha)* para quantificação de toxinas em cereais e frutos secos. O número de poços utilizados, da placa de microtitulação deste *kit*, equivaleu ao número de amostras a analisar, acrescidos de um poço para o padrão, isto é com concentração de 0 ppb. Pipetaram-se, para poços individuais, 50 µL da amostra padrão e 50 µL da amostra preparada. Seguidamente adicionaram-se 50 µL do conjugado (complexo toxina-enzima(peroxidase)) a cada poço e 50 µL da solução de anticorpo secundário (para aflatoxinas) e incubou-se durante cerca de 10 minutos à temperatura ambiente. Após o passo de lavagem (efetuado três vezes seguidas com tampão de fosfato contendo 0,05% de *Tween 20*), adicionaram-se 100 µL de substrato/cromogénico (peróxido de hidrogénio-ureia / tetrametilbenzidina) e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos no escuro. Por fim, adicionaram-se 100 µL de uma solução *Stop*, com agitação moderada e mediu-se a absorvância a 450 nm no leitor de placas de microtitulação *Stat Fax 4700*.

Para a determinação da aflatoxina B₁ utilizou-se o *kit Ridascreen Aflatoxin B1 30/15* (*R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha*). Neste caso a preparação da amostra foi igual à anteriormente descrita. O número de poços, da placa de microtitulação do *kit*, utilizados equivaleu ao número de amostras a analisar, acrescidos de um poço para cada um dos seguintes padrões (0, 1, 5, 10, 20 e 50 ppb) fornecidos no *kit*. Pipetaram-se, para poços individuais, 50 µL dos padrões e 50 µL das amostras preparadas. Seguidamente adicionaram-se 50 µL do conjugado (complexo toxina-enzima(peroxidase)) em cada poço e 50 µL da solução de anticorpo secundário (para a aflatoxina B₁) e incubou-se durante cerca de 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida, segue-se o mesmo procedimento de lavagem que no caso anterior. Após o passo de lavagem adicionaram-se 100 µL de substrato/cromogéneo (peróxido de hidrogénio-ureia / tetrametilbenzidina) e incubou-se à temperatura ambiente durante 15 minutos no escuro. Por fim, adicionaram-se 100 µL de uma solução *Stop*, com agitação moderada e mediu-se a absorvância a 450 nm no leitor de placas de microtitulação *Stat Fax 4700*.

7.1.2 Determinação da ocratoxina A

No caso da determinação da ocratoxina A, a preparação das amostras envolve mais cuidado em comparação com as anteriores. Após recolha da amostra e estando esta homogeneizada, adicionam-se 5 g da amostra a 5 mL de uma solução 0,13 M de NaHCO₃ e 20 mL de uma solução de metanol a 25%, com agitação durante 10 minutos. De seguida, a mistura é centrifugada numa centrífuga *Nahita 2640/8* (*Nahita, Hyogo, Japão*) durante 10 minutos a uma rotação de 4000 rpm. O sobrenadante é, seguidamente, filtrado através de um filtro *RS* (*Filtres Durieux, Torcy, França*). Finalmente adicionaram-se 10 mL do filtrado a 10 mL de solução 0,13M de NaHCO₃.

Neste método foi necessário utilizar uma coluna de imunoafinidade (*R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha*) para purificação da amostra, lavada com 2 mL de uma solução NaHCO₃/metanol (90/10) antes da eluição da amostra a uma velocidade de 1 gota/segundo (velocidade de eluição descrita de acordo com os protocolos *Ridascreen Fast Ochratoxin A R5402* e *Ridascreen Ochratoxin A Columns R1303*). Após novo passo de lavagem com 5 mL de uma solução NaHCO₃/metanol (90/10), é efetuada a desorção da amostra a analisar com 1 mL de metanol a 100% e finalmente adicionados 2 mL de água destilada.

Para a determinação da ocratoxina A utilizou-se o *kit Ridascreen Fast Ochratoxin A* (*R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha*). O número de poços, da placa de microtitulação do *kit*, utilizados equivaleu ao número de amostras a analisar, acrescidos de um poço para cada um dos seguintes padrões (0, 5, 10, 20 e 40 ppb) fornecidos no *kit*. Mais uma vez, pipetaram-se, para poços individuais, 50 µL dos padrões e 50 µL das amostras preparadas. Seguidamente adicionaram-se 50 µL do conjugado (complexo toxina-enzima(peroxidase)) em cada poço e 50 µL da solução de anticorpo secundário (para a ocratoxina A) e incubou-se durante cerca de 10 minutos à temperatura ambiente. De seguida, segue-se o mesmo procedimento de lavagem que nos casos anteriores. Após o

passo de lavagem adicionaram-se 100 µL de substrato/cromogénio (peróxido de hidrogénio-ureia / tetrametilbenzidina) e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos no escuro. Por fim, adicionaram-se 100 µL de uma solução *Stop*, com agitação moderada e mediu-se a absorvância a 450 nm no leitor de placas de microtitulação *Stat Fax 4700*.

Os resultados da concentração de toxinas, para todos os casos, são obtidos através do *software Ridasoft Win* (o programa, gera automaticamente a curva de calibração) em µg micotoxinas / Kg amostra. Contudo, na determinação da ocratoxina A, ao resultado da concentração deve-se multiplicar por um factor de 0,3 (de acordo com os protocolos *Ridascreen Fast Ochratoxin A R5402* e *Ridascreen Ochratoxin A Columns R1303*).

7.1.3 Contagem de bolores e leveduras

Foi proposto ainda, no decurso deste estudo, quantificar os bolores e leveduras potencialmente patogénicos, presentes num lote de amêndoa granulada 1886 que apresentou os maiores valores de contaminação por aflatoxinas totais e aflatoxina B₁. Para isso seguiu-se o procedimento descrito na norma ISO 7954, que fornece rege o procedimento de contagem, a 25 °C, de bolores e leveduras potencialmente patogénicos.

Em microbiologia, os meios de cultura permitem a multiplicação de microrganismos sob condições controladas, permitindo o seu isolamento e caracterização morfológica e bioquímica. As exigências dos microrganismos são muito específicas e por isso o meio de cultura utilizado tem de corresponder às exigências do microrganismo em estudo. O meio utilizado para a seleção dos fungos em estudo foi o meio Agar Sabouraud adicionado de cloranfenicol, preparado a partir de meio desidratado comercialmente disponível. Foi também necessário proceder à preparação de água peptonada, para a preparação das amostras, e ambos os meios foram posteriormente esterilizados a 118 °C na autoclave *Steam Sterilizer Trade (Raypa, Barcelona, Espanha)* durante 15 minutos. A preparação das amostras seguiu a norma ISO 6887-1, tendo-se realizado 3 diluições decimais (10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³) sucessivas da amostra inicial, em condições de assepsia numa câmara de fluxo laminar *V-100 (Telstar, Terrassa, Espanha)*, em água peptonada.

Para cada diluição, e produto alimentar estudado, utilizada foram realizados ensaios em triplicado, tendo sido utilizado o método inoculação por incorporação. Assim, para cada ensaio inoculou-se, sob condições de assepsia, 1 mL de cada uma das diluições para a placa de Petri respetiva (em triplicado). Posteriormente, com uma pipeta estéril, transferiram-se 15 mL do meio de cultura para cada placa de Petri, e agitou-se delicadamente o conteúdo na placa de Petri descrevendo movimentos circulares. Por fim, deixou-se solidificar o meio e incubaram-se as placas invertidas a 25 °C durante 5 dias numa incubadora *IncuTerm Digit Trade (Raypa, Barcelona, Espanha)*.

7.2 Resultados e análise de resultados

Neste subcapítulo são apresentados todos os resultados obtidos e simultaneamente a sua análise.

7.2.1 Dados complementares

Durante o período das análises foram recolhidas informações complementares para suportar os resultados obtidos das micotoxinas. Diariamente foi registada a temperatura de transformação dos produtos fritos e torrados e ainda o seu tempo de processamento. A temperatura dos produtos torrados foi medida continuamente através de uma sonda inserida no interior dos fornos (*Joper, Canelas, Portugal*). A temperatura de fritura é lida com o uso de um termómetro *Oliester (Vito, Mol, Bélgica)*. Foi ainda registada a temperatura ambiente de cada secção, e a respetiva humidade com o auxílio de um termohigrómetro *ETI Large Display Thermo Hygrometer (ETI Ltd., Worthing, Reino Unido)* com a finalidade de monitorizar e controlar as condições de armazenamento a que os produtos estão sujeitos. Por fim, foi medida a percentagem de oxigénio das embalagens de diferentes quantidades (gramagens) contendo o produto acabado, com uma sonda *PBI (Dansensor, Ringsted, Dinamarca)*. As seguintes tabelas apresentam os valores médios dos resultados da temperatura e tempo de processamento obtidos.

Tabela 2 – Temperaturas médias e duração do processo de transformação dos produtos torrados.

Produto	Temperatura média (°C)	Tempo médio do processamento
Amendoim com casca	300	3 h
Amêndoa	128	20 min.
Pistacho	130	15 min.

Tabela 3 – Temperaturas médias e duração do processo de transformação dos produtos fritos.

Produto	Temperatura média (°C)	Tempo médio do processamento
Amendoim	144	8 min.
Amêndoa	140	3 min.
Caju	135	3 min.

Verifica-se, assim, que as temperaturas médias de processamento dos produtos alimentares são inferiores às temperaturas de decomposição das principais micotoxinas analisadas, pelo que este processo pode não eliminar completamente os níveis das toxinas presentes.

No tocante ao registo de temperatura e humidade das diferentes secções da instalação industrial da *Frutorra Pimenta, Lda.*, os resultados foram divididos em dois períodos: Novembro de 2015 a Março de 2016; e Abril a Julho de 2016, tendo em consideração a alteração nas condições ambientais devido à mudança de estações.

Tabela 4 – Temperaturas e humidades médias das secções da instalação industrial da *Frutorra Pimenta, Lda* nos meses de Novembro de 2015 a Março de 2016.

Secção	Novembro a Março	
	Temperatura média (°C)	Humidade média (%)
Armazém de matérias-primas	13,3	70
Armazém de produto semiacabado	12,6	69,5
Armazém de produto acabado	12,3	68

Tabela 5 – Temperaturas e humidades médias das secções da instalação industrial da *Frutorra Pimenta, Lda* nos meses de Abril a Julho de 2016.

Secção	Abril a Julho	
	Temperatura média (°C)	Humidade média (%)
Armazém de matérias-primas	18,4	62
Armazém de produto semiacabado	18,9	56
Armazém de produto acabado	18,3	55

Quanto às temperaturas e humidades medidas para as diferentes secções, verifica-se que no período de Novembro de 2015 a Março de 2016 a humidade apresenta valores mais elevados (mas temperaturas mais baixas), enquanto que no período de Abril a Julho de 2016 apresenta valores mais baixos (mas temperaturas mais elevadas). Embora os valores medidos não sejam os ótimos para o crescimento dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, produtores das micotoxinas estudadas, a possibilidade de existir crescimento destas espécies, nas condições referidas, não pode ser excluída, e principalmente no tocante ao género *Penicillium*.

Tabela 6 – Percentagem de oxigénio presente em cada embalagem de produto final.

Gramagem das embalagens (g)	% O ₂
25	0,9
150	4,1
250	5,3
500	11,6
1000	13,9

A disponibilidade de oxigénio numa embalagem de produto alimentar é uma variável que afeta bastante o crescimento de fungos, por isso, os grãos devem ser armazenados em baixos teores de oxigénio. Tendo em vista os valores médios da percentagem de oxigénio obtidos para as diferentes gramagens, observa-se que a percentagem de oxigénio é proporcional à quantidade de produto. Desta forma, pode-se afirmar que a

proliferação dos géneros fúngicos em causa aumenta à medida que aumenta a quantidade de produto nas embalagens.

7.2.2 Aflatoxinas totais

Como forma de entender se existe um aumento de contaminação dos alimentos por micotoxinas no decorrer da sua linha de produção na instalação industrial da *Frutorra Pimenta, Lda.*, foram realizados testes aos produtos alimentares quer aquando da sua receção, quer após a transformação dos mesmos. Saliente-se ainda que todos os produtos que sofrem transformação, quer por fritura quer por torra, são processados, embalados e expedidos nos dias seguintes à receção do produto. Como consequência, e tendo em consideração por um lado os benefícios e prejuízos económicos para a *Frutorra Pimenta, Lda.*, e por outro o curto período de transformação do produto na unidade industrial, não foram efetuadas análises nos passos intermédios a todos os produtos.

Os resultados para as concentrações totais de aflatoxinas, apresentados nas tabelas seguintes, encontram-se separados em produtos fritos (caju e amendoim), produtos torrados (amendoim e pistacho), amêndoas processadas (amêndoa com pele e sem pele) e amêndoas apenas transformadas mecanicamente (amêndoa laminada, palitada, granulada e farinha de amêndoa).

Todos os cálculos necessários para a obtenção dos resultados apresentados nas tabelas abaixo, encontram-se descritos no anexo 10.2.1. Saliente-se ainda que são descritos dois tipos de concentração nestas tabelas: concentrações calculadas e concentrações reais. As primeiras reportam-se à determinação das concentrações a partir das absorvâncias lidas e utilizando-se a curva de calibração representada no anexo 10.2.1, enquanto que as segundas são obtidas automaticamente pelo *software* do equipamento utilizado.

Tabela 7 – Concentrações totais de aflatoxinas calculadas e reais para os produtos fritos (caju e amendoim), antes (1) e após (2) a fritura.

Lote	Origem	Concentração (ppb)		Concentração (ppb)		% erro (1)	% erro (2)
		Calculada (1)	Real (1)	Calculada (2)	Real (2)		
Produto frito: Caju							
1046	Vietname	1,667	1,670	0,897	0,903	0,2	0,6
1386	Índia	0,022	0,067	0,749	0,754	67,0	0,6
1036	Vietname	0,640	0,644	0,493	0,497	0,6	0,8
1816	Vietname	1,553	1,560	0,443	0,447	0,4	0,8
1826	Vietname	1,609	1,620	1,144	1,150	0,7	0,5
1646	Vietname	1,433	1,440			0,5	
1986	Índia	1,229	1,240			0,9	
2226	Vietname	1,363	1,370			0,5	
2236	Vietname	1,554	1,560			0,4	
Produto frito: Amendoim							
1096	Brasil	1,670	1,670	0,351	0,354	0,2	0,8
1376	Brasil	1,110	1,120	0,491	0,495	0,6	0,8
1656	Argentina	1,990	2,000	0,321	0,324	0,3	1,0
1766	Argentina	1,780	1,790	0,347	0,350	0,6	0,8
1776	Argentina	1,320	1,330	0,585	0,589	0,8	0,7
1936	Brasil	0,940	0,943	0,755	0,759	0,6	0,6
2266	Brasil	2,740	2,750	0,280	0,283	0,5	0,9
2286	Brasil	1,500	1,510			0,7	
2826	Brasil	1,740	1,740			0,2	
2936	Brasil	0,880	0,884			0,6	

Numa primeira análise aos resultados apresentados na tabela anterior, pode-se verificar que as concentrações calculadas, para o amendoim e para o caju, através da construção da curva de calibração representada no anexo 10.2.1 apresentam valores muito próximos às concentrações reais, com valores de percentagem de erro relativo inferiores a 1%. De facto, atendendo aos resultados apresentados também nas tabelas seguintes para as aflatoxinas, a análise anterior pode ser estendida para os mesmos.

Verifica-se também que a concentração das aflatoxinas totais foi inferior aos limites máximos toleráveis estabelecidos na legislação, quer para a matéria-prima quer para o produto após processamento. De facto, para os lotes analisados os produtos em causa cumpriram sempre a legislação para a contaminação por aflatoxinas totais em vigor, que refere um limite de 4 µg/Kg (ppb) para o conjunto das aflatoxinas B₂, G₁ e G₂ e de 2 µg/Kg (ppb) para a aflatoxina B₁. Existiu um único caso (lote 2266) em que a amostra de matéria-prima rececionada ultrapassou o valor de 2 µg/Kg (ppb), tendo sido necessário determinar a quantidade da aflatoxina B₁ em particular para se poderem retirar mais ilações.

Mais, verificou-se ainda que os níveis de contaminação por aflatoxinas totais diminuíram sempre após o processo de fritura (à exceção do lote de caju 1386). De facto, analisando os resultados obtidos, pode-se concluir que o processamento por fritura para o caju diminuiu os teores de aflatoxinas totais para, em média, 57,7% do valor inicial, e no caso do amendoim para 33,8% do valor inicial. Pode-se concluir, deste modo, que o processo de fritura teve um impacto significativo na degradação das aflatoxinas presentes na matéria-prima, o que seria razoavelmente expectável devido às temperaturas de degradação, reportadas na literatura, das mesmas.

Evidenciou-se ainda um caso particular nesta análise, nomeadamente o do lote de caju 1386. Esse lote apresentou uma concentração de aflatoxinas na matéria-prima de 0,067 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (com um erro relativo de 67%) e uma concentração de 0,754 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ depois de ser submetido a um processo térmico. Uma possível explicação para este facto pode residir numa deficiente representatividade da amostra da matéria-prima recolhida, uma vez que os valores obtidos diferem grandemente dos outros lotes rececionados. Deste modo é crível que o aumento da concentração de aflatoxinas totais, verificado após a fritura, não resulte de qualquer tipo de contaminação no produto estando, de facto, em linha com resultados obtidos para outros lotes. Apesar de as amostras dos lotes a analisar serem compostas de pequenas porções recolhidas de diferentes locais para se obter uma matriz mais representativa, o processo de amostragem pode sempre constituir uma fonte de erros. Outra explicação possível poderá ter ocorrido devido a erros experimentais no decurso da determinação da concentração das aflatoxinas totais.

No tocante aos produtos torrados (amendoim com casca e pistacho), a tabela seguinte apresenta os resultados obtidos para as concentrações totais de aflatoxinas.

Tabela 8 – Concentrações totais de aflatoxinas calculadas e reais, para os produtos torrados, antes (1) e após (2) a torra.

Lote	Origem	Concentração (ppb)		Concentração (ppb)		% erro (1)	% erro (2)
		Calculada (1)	Real (1)	Calculada (2)	Real (2)		
Produto torrado: Amendoim com casca							
1126	EUA	2,041	2,050	1,592	1,600	0,5	0,5
1316	EUA	2,455	2,460	0,387	0,390	0,2	0,7
1306	EUA	2,708	2,720	1,522	1,530	0,4	0,5
1436	China	1,495	1,500	0,363	0,366	0,3	0,8
1486	EUA	0,656	0,660	0,827	0,832	0,6	0,6
2296	EUA	1,938	1,950	0,108	0,109	0,6	1,1
1426	China	1,871	1,880			0,5	
1346	EUA	1,465	1,470			0,3	
2166	EUA	2,555	2,560			0,2	
2276	EUA	1,895	1,900			0,3	
2416	China	0,663	0,667			0,6	
3136	China	1,618	1,630			0,7	
Produto torrado: Pistacho							
1176	Irão	1,408	1,410	0,850	0,855	0,1	0,6
0416	Irão	1,085	1,090	0,966	0,971	0,4	0,5
1636	Espanha	1,639	1,650	1,394	1,400	0,6	0,4
0316	Irão	2,805	2,810	1,504	1,510	0,2	0,4
1166	Irão	1,536	1,540			0,3	
2216	Espanha	1,911	1,920			0,5	
3016	Espanha	1,802	1,810			0,5	
3026	Irão	1,337	1,340			0,2	
3116	Irão	0,800	0,805			0,7	

Da análise da tabela anterior verifica-se, mais uma vez, que a concentração das aflatoxinas totais foi sempre inferior aos limites máximos toleráveis estabelecidos na legislação, quer para a matéria-prima quer para o produto após processamento. Contudo, existiram neste caso algumas amostras de matéria-prima rececionada que ultrapassaram o valor de 2 µg/Kg (ppb), tendo sido necessário determinar a quantidade da aflatoxina B₁ em particular para se poderem retirar mais ilações. Tal como sucedeu para os produtos fritos, também os produtos torrados sofreram um decréscimo do valor de aflatoxinas total após transformação. Analisando os resultados obtidos, pode-se concluir que o processamento por torra para o amendoim com casca diminuiu os teores de aflatoxinas totais para, em média, 51,0% do valor inicial, e para o pistacho 72,1% do valor inicial. Mais uma vez se pode concluir que o processo de torra teve um impacto significativo na degradação das aflatoxinas presentes na matéria-prima, o que seria mais uma vez expectável.

Mais uma vez se evidenciou um caso particular nesta análise, nomeadamente o do lote de amendoim com casca 1486, que apresentou um valor de 0,660 µg/Kg para o produto à receção e um valor de 0,832 µg/Kg para produto acabado, ou seja um aumento de 26,1%. Contudo, mais uma vez, os valores obtidos para a matéria-prima deste lote diferem grandemente da grande maioria dos outros lotes rececionados, pelo que poderá ter existido algum problema de representatividade da amostra analisada ou mesmo um erro experimental no decurso da determinação da concentração das aflatoxinas totais.

Relativamente às amêndoas, estas chegam à fábrica em dois tipos: com pele e sem pele, podendo ser sujeitas a processamento térmico (torra e fritura, respetivamente). Já no caso da amêndoa granulada, palitada, laminada e da farinha de amêndoa, transformadas mecanicamente anteriormente, não sofrem qualquer alteração na *Frutorra Pimenta, Lda.*, sendo apenas escolhidas a fim de retirar qualquer contaminante físico, e posteriormente embaladas.

As seguintes tabelas apresentam os resultados obtidos para as amêndoas, quer as que sofreram processamento térmico na unidade industrial da *Frutorra Pimenta, Lda.* quer as que não sofreram transformação nesta unidade.

Tabela 9 – Concentrações totais de aflatoxinas calculadas e reais para as amêndoas transformadas, antes (1) e após (2) a transformação.

Lote	Origem	Concentração (ppb)		Concentração (ppb)		% erro (1)	% erro (2)
		Calculada (1)	Real (1)	Calculada (2)	Real (2)		
1256	EUA	0,881	0,887	0,048	0,145	0,6	67,1
1266	EUA	1,354	1,36	0,879	0,885	0,4	0,6
1446	EUA	1,915	1,92	0,554	0,558	0,3	0,6
1546	EUA	1,454	1,46	0,847	0,852	0,4	0,6
2046	EUA	5,975	5,98	1,549	1,56	0,1	0,7
1556	EUA	0,936	0,941			0,5	
1356	EUA	0,817	0,822			0,6	
1786	EUA	1,148	1,15			0,2	
1796	EUA	1,391	1,4			0,7	
1806	EUA	1,499	1,51			0,8	
1966	EUA	2,845	2,85			0,2	
2026	EUA	0,948	0,954			0,6	
2036	EUA	1,705	1,71			0,3	

Analisando os resultados da tabela anterior, relativa às amêndoas que sofreram transformação, verificou-se que a concentração das aflatoxinas totais foi, sempre, inferior ao valor de 10 µg/Kg (ppb) referido na legislação para este produto alimentar. Mais, nenhum lote superou o valor de 8 µg/Kg (ppb), referente à aflatoxina B₁. Mais uma vez se verificou que todos os lotes analisados apresentaram um decréscimo no valor da concentração da matéria-prima para o produto transformado, tendo os teores de aflatoxinas totais diminuído para, em média, 39,0% do valor inicial. Pode-se concluir, deste modo, que o processamento térmico teve um impacto muito significativo na degradação das aflatoxinas presentes na matéria-prima.

Tabela 10 – Concentrações totais de aflatoxinas calculadas e reais para as amêndoas sem transformação na unidade industrial da *Frutorra Pimenta, Lda.*

Lote	Origem	Concentração (ppb)		
		Calculada	Real	% Erro
1586	EUA	0,931	0,936	0,5
1596	EUA	2,857	2,870	0,5
1396	EUA	2,125	2,130	0,2
1416	EUA	0,069	0,070	1,8
1406	EUA	0,974	0,980	0,6
1466	EUA	0,279	0,281	0,7
1476	EUA	1,937	1,940	0,2
1456	EUA	0,236	0,238	0,7
1886	EUA	6,493	6,500	0,1
1906	EUA	0,566	0,570	0,6
1896	EUA	0,274	0,276	0,7
1926	EUA	0,666	0,671	0,7
1916	EUA	0,076	0,077	1,3
2066	EUA	2,672	2,680	0,3
2056	EUA	5,881	5,890	0,1

Tal como para as amêndoas transformadas, no tocante às amêndoas não transformadas na unidade industrial da *Frutorra Pimenta, Lda.* a concentração de aflatoxinas foi, sempre, inferior ao valor de 10 µg/Kg (ppb). Mais, nenhum lote superou o valor de 8 µg/Kg (ppb), referente à aflatoxina B₁. Contudo, por uma questão de constância de metodologia de monitorização, optou-se por determinar a concentração da aflatoxina B₁ em todas as amostras (incluindo as do produto alimentar amêndoa), que apresentaram valores de aflatoxinas totais superiores a 2 µg/Kg (ppb). Desta forma, os lotes 2046 e 1966 de amêndoas transformadas, e os lotes 1886 (amêndoa granulada) e 2056 (farinha de amêndoa) foram estudados seguidamente para aferir da concentração da aflatoxina B₁.

7.2.3 Aflatoxina B₁

Os produtos analisados para contaminações de aflatoxinas B₁ foram todos os lotes que anteriormente apresentaram um resultado superior a 2 µg/Kg para as aflatoxinas totais, uma vez que é esse o limite máximo tolerável desta toxina para a maioria dos produtos alimentares analisados. Por uma questão de constância de metodologia de monitorização, optou-se ainda por determinar a concentração da aflatoxina B₁ nas amostras do produto alimentar amêndoa, que superaram esse valor para aflatoxinas totais. Os resultados obtidos para a determinação das micotoxinas B₁ encontram-se tabelados de seguida.

Tal como no subcapítulo anterior, as curvas de calibração correspondente à determinação da concentração da aflatoxina B₁ encontram-se em anexo (10.2.2).

Tabela 11 – Resultados das concentrações de aflatoxina B₁ dos produtos analisados.

Produto	Lote	Origem	Concentração (ppb)		
			Calculada	Real	% Erro
Amendoim com casca	1316	EUA	0,528	0,532	0,75
Amendoim com casca	1306	EUA	0,405	0,409	0,98
Amêndoa laminada	1396	EUA	0,285	0,288	1,04
Farinha de amêndoa	1596	EUA	0,290	0,293	1,02
Pistacho cru	0316	Irão	0,010	0,010	0,00
Amêndoa granulada	1886	EUA	4,819	4,830	0,23
Amêndoa	1966	EUA	1,073	1,080	0,65
Amêndoa	2046	EUA	1,892	1,900	0,42
Farinha de Amêndoa	2056	EUA	2,004	2,010	0,30
Amêndoa laminada	2066	EUA	0,261	0,263	0,76
Amendoim com casca	2166	EUA	0,746	0,752	0,80
Amendoim despelado	2266	Brasil	0,249	0,252	1,19

Numa primeira análise aos resultados apresentados na tabela anterior, pode-se verificar que as concentrações calculadas, através da construção da curva de calibração representada no anexo 10.2.1, apresentam valores muito próximos às concentrações reais, com valores de percentagem de erro relativo inferiores a 1%.

Analisando os resultados das concentrações da aflatoxina B₁, verifica-se que nenhum lote ultrapassou o valor máximo tolerável (2 µg/Kg para a generalidade dos produtos alimentares) de acordo com a legislação. De facto, os únicos lotes com concentrações desta toxina superiores a 2 µg/Kg corresponderam à amêndoa granulada (lote 1886), com uma concentração de 4,83 µg/Kg e à farinha de amêndoa (lote 2056), com uma concentração de 2,01 µg/Kg, ambas com origem nos Estados Unidos. Contudo, segundo

a legislação em vigor (Regulamento nº 165 de 2010, anexo 2.1.6), para as amêndoas destinadas ao consumo humano direto, o teor máximo tolerável de aflatoxina B₁ é de 8 µg/Kg. Como descrito anteriormente, em nenhum caso, este valor foi ultrapassado.

7.2.4 Ocratoxina A

Tal como foi feito para as aflatoxinas, também foram realizados testes aos alimentos propícios à contaminação por ocratoxina A, para controlar a qualidade do produto. De entre os produtos mais propícios a serem contaminados por ocratoxina A, encontram-se as passas de uva, sultanas e coríntios, analisados no decurso deste trabalho. Assim, a tabela seguinte apresenta os resultados obtidos.

No anexo 10.2.3 encontra-se as curvas de calibração usadas para a determinação das concentrações de ocratoxina A.

Tabela 12 – Concentrações de ocratoxina A para os produtos analisados, suscetíveis de contaminação.

Produto	Lote	Origem	Concentração (ppb)		
			Calculada	Real	% Erro
Passa de uva	1716	África do sul	0,627	0,629	0,27
Sultana	1866	Turquia	0,588	0,609	3,44
Sultana	2246	Turquia	0,783	0,797	1,81
Corintos	2586	Grécia	0,467	0,478	2,20

Segundo a legislação em vigor, pode-se concluir que os produtos analisados se encontram abaixo do limite máximo tolerável para a ocratoxina A (10 µg/Kg). De facto, os valores de concentração obtidos são muito baixos, com a maior concentração a reportar-se à sultana (lote 2246) com origem na Turquia. Verificou-se ainda que a concentração calculada foi ligeiramente inferior à concentração real, mas com um erro percentual que, apesar de superior para os estudos das aflatoxinas, foi em todos os casos menor que 4%, logo bastante aceitável.

7.2.5 Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras, pela norma ISO 7954, permite avaliar a qualidade microbiana dos produtos alimentares em relação aos bolores e leveduras potencialmente patogénicos. Desta forma, a monitorização do crescimento destes fungos, permite uma aferição, ainda que indireta, do possível crescimento dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* e, conseqüentemente, da produção de micotoxinas (Olga 1996). Desta forma, este teste foi utilizado como suporte adicional ao resultado obtido anteriormente para as concentrações de aflatoxinas.

Assim, efetuou-se a determinação de bolores e leveduras, potencialmente patogénicos, para o lote de amêndoa granulada 1886, uma vez que este produto apresentou o maior

valor de concentração de aflatoxinas totais e da aflatoxina B₁ (6,5 µg/Kg e 4,83 µg/Kg, respetivamente). A tabela seguinte, descreve os resultados para a contagem de fungos e leveduras potencialmente patogénicos.

Tabela 13 – Resultados obtidos para a contagem de bolores de leveduras para o lote 1886.

Diluição	Contagem de colónias
10 ⁻¹	Incontáveis
10 ⁻²	15 16
10 ⁻³	5 8

Nas imagens seguintes é possível observar as placas de Petri para cada diluição, ao fim de 5 dias de incubação, em Agar Sabouraud com cloranfenicol.

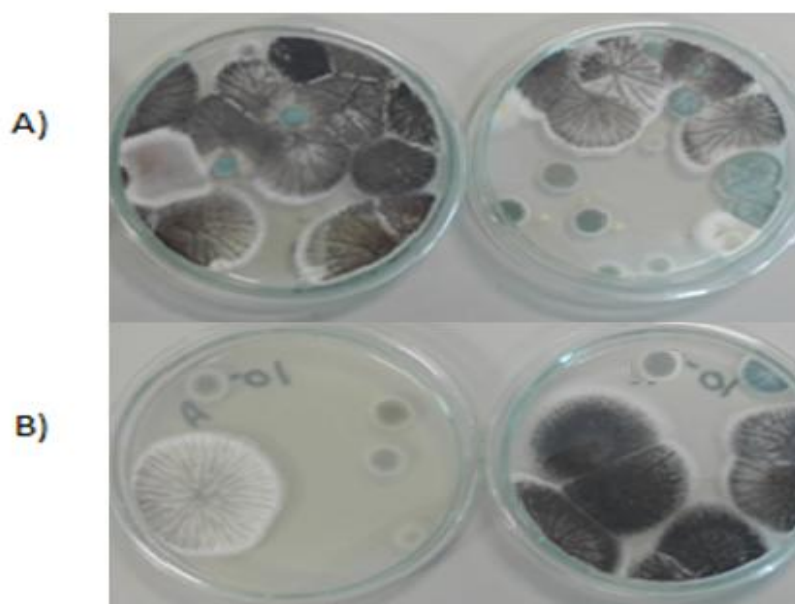


Figura 25 – Placas de Petri ao fim de 5 dias de incubação por incorporação para o lote 1886. (A) Diluição 10⁻²; (B) Diluição 10⁻³.

A partir dos valores obtidos, pode-se estimar o valor da quantidade de bolores e leveduras por grama de amêndoa granulada do lote 1886, como sendo 2×10^3 ufc/g. De acordo com a ISO 4833-1:2013, o valor limite, para bolores e leveduras, no tocante à qualidade microbiológica destes produtos alimentares é 1×10^5 ufc/g. Uma vez que o valor obtido para este lote é inferior ao legislado, pode-se concluir que o lote 1886 se encontrava dentro dos parâmetros microbiológicos aceitáveis.

Após o crescimento dos fungos nas placas de Petri foi ainda efetuada uma identificação aproximada dos tipos de fungos presentes. Para o efeito foi efetuada uma inspeção

visual às colónias macroscópicas e efetuada uma observação microscópica a uma preparação em lâmina e lamela de uma amostra das mesmas, que se apresenta na figura seguinte. Apenas se conseguiu visualizar um tipo das colónias ao microscópio. A visualização macroscópica das colónias de fungos com cor negra e cujo corpo de frutificação é apresentado na figura seguinte parece indicar que se trata do género *Aspergillus*. Esta assunção toma mais força tendo em atenção os valores da aflatoxina B₁ determinados para esta amostra. Contudo, será necessário efetuar mais testes para se poder retirar uma conclusão definitiva.

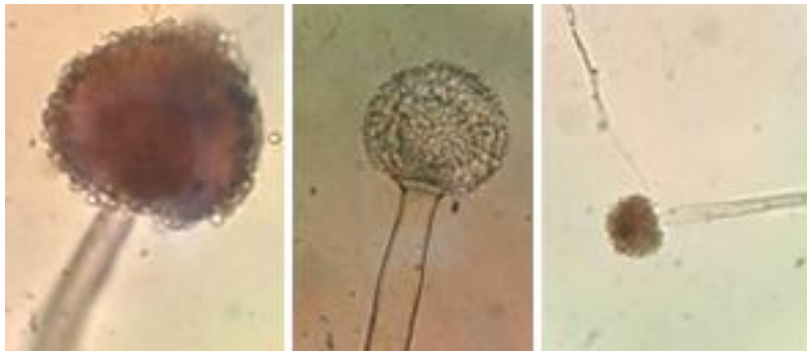


Figura 26 – Imagens microscópicas das colónias com crescimento nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} .
(Ampliação 40x)

8. Conclusões

O presente trabalho aborda a temática da micotoxicologia com o principal objetivo de estudar a avaliação da presença das micotoxinas na indústria alimentar e contribuir para a diminuição de contaminação.

A ocorrência das micotoxinas nos produtos alimentares acaba por ser inevitável, já que são compostos naturais produzidos por diversas espécies de fungos. Contudo é possível reduzir os níveis destes contaminantes na indústria alimentar através da implementação de medidas de monitorização e controlo. O método de monitorização de micotoxinas utilizado neste trabalho foi um método rápido aprovado oficialmente, método ELISA competitivo, uma ferramenta importante para a deteção de toxinas no controlo da qualidade de alimentos. Contudo, é importante referir que este tipo de métodos são utilizados apenas para controlo, uma vez que, podendo os resultados negativos serem considerados efetivamente negativos, os resultados positivos devem ser confirmados por métodos padrões.

A monitorização dos produtos alimentares (matérias-primas) recebidos na instalação industrial da *Frutorra Pimenta, Lda.* constitui o ponto fulcral do programa de controlo de micotoxinas (maioritariamente aflatoxinas e ocratoxina A), por esta empresa. Desta forma, os produtos estudados foram analisados à chegada da fábrica, como forma de decidir a conformidade toxicológica (aflatoxinas totais, aflatoxina B₁ e ocratoxina A) dos mesmos. Porém, tendo em atenção que a contaminação dos produtos alimentares também pode surgir no decurso da sua linha de produção, foram ainda analisadas amostras após a sua transformação.

Analisando os dados obtidos neste estudo podem-se retirar algumas conclusões gerais importantes. Na esmagadora maioria dos lotes analisados à chegada das matérias-primas, os valores determinados para as micotoxinas estudadas encontravam-se abaixo dos valores máximos toleráveis (4 µg/Kg para aflatoxinas totais, 2 µg/Kg para a aflatoxina B₁ e 10 µg/Kg para a ocratoxina A, na maior parte dos produtos analisados). Por outro lado, também se verificou que não existiu, nos lotes de produtos alimentares analisados, aumento dos níveis das micotoxinas estudadas ao longo do processo de produção na *Frutorra Pimenta, Lda.* Pelo contrário, foi notória uma redução significativa destes níveis pelo processamento efetuado aos produtos alimentares.

De facto, nos lotes dos produtos transformados (fritos ou torrados) analisados, observou-se que a concentração de aflatoxinas totais diminuiu em média para 57,7% (caju), 33,8% (amendoim), 51,0% (amendoim com casca), 72,1% (pistacho) e 39,0% (amêndoa) do valor inicial. Pode-se concluir, deste modo, que o processamento efetuado (fritura ou torra) teve um impacto significativo na degradação das aflatoxinas totais presentes na matéria-prima, expectável devido às temperaturas de degradação,

reportadas na literatura, das mesmas. Mais, analisando a globalidade dos dados obtidos, apenas em alguns casos isolados (lote de caju 1386 e lote de amendoim com casca 1486) se verificou um aumento da concentração de aflatoxinas totais. Contudo, este aumento pode ser atribuído, muito provavelmente, a problemas de representatividade da amostra, ou mesmo a erros experimentais, e não a um aumento real da concentração destas toxinas. De facto, em alimentos sólidos, a distribuição não uniforme das micotoxinas no lote pode originar variabilidade nos resultados, consoante o volume recolhido, sendo a representatividade da amostragem um ponto fundamental para o controlo de micotoxinas.

Apenas em três lotes analisados, os valores dos níveis de toxinas obtidos suscitaram alguma preocupação, nomeadamente o lote de amêndoa granulada 1886 (6,5 µg/Kg para aflatoxinas totais e 4,83 µg/Kg para aflatoxina B₁), lote de amêndoas 2046 (5,98 µg/Kg para aflatoxinas totais) e lote de amêndoas 2056 (5,89 µg/Kg para aflatoxinas totais). Tendo-se verificado os maiores valores de aflatoxinas para o lote 1886, foi realizada, para este lote, uma contagem de bolores e leveduras, potencialmente patogénicos, a 25°C, na qual se obteve um valor estimado de 2×10^3 ufc/g (presumivelmente do género *Aspergillus*, de acordo com o tipo de colónias formadas e observação ao microscópio). Desta forma pode-se concluir que este lote se encontrava dentro dos parâmetros microbiológicos aceitáveis.

A temperatura e a humidade das instalações da linha de produção da *Frutorra Pimenta, Lda.* foram também monitorizadas com a finalidade de perceber se as condições de armazenamento eram apropriadas. Pode-se constatar que, embora os valores obtidos não sejam os ótimos para o crescimento dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, produtores das micotoxinas estudadas, não pode ser liminarmente excluída a possibilidade de existir crescimento destas espécies, e conseqüente de produção de micotoxinas, nas condições referidas. Mais, especial atenção deve ser dada aos produtos embalados em pacotes de maior capacidade (gramagem), devido aos níveis de oxigénio obtidos para os mesmos.

Numa conclusão final, provou-se a utilidade do método escolhido para a monitorização e controlo dos produtos alimentares analisados na instalação industrial da *Frutorra Pimenta, Lda.* Ainda que não tenham sido ultrapassados os limites máximos toleráveis, presentes na legislação, foi possível determinar e caracterizar alguns lotes de matérias-primas que suscitaram alguma preocupação. Mais, foi ainda possível, por este processo de monitorização, quantificar a redução dos níveis das aflatoxinas totais decorrentes do processamento de alguns produtos alimentares. De facto, a necessidade de serem mantidos programas de monitorização e controlo, quer das matérias-primas, quer dos produtos acabados, para a obtenção de um produto com qualidade é, por demais, reconhecida.

9. Referências bibliográficas

- Abarca, ML, F Accensi, MR Bragulat, e FJ Cabanes. *Current importance of Ochratoxin A-Producing Aspergillus*. J Food Prot., 2001.
- Abramson, D. "Factors in mycotoxin formation." In *Mycotoxin in agriculture and food safety*. 1998.
- Abrar, M, F.M Anjum, M.S Butt, I Pasha, e M.A Randhawa. *Aflatoxins: biosynthesis, occurrence, toxicity and remedies*. Crit. Rev. Food Sci.Nutr, 2013.
- Adegoke, G.O. *Understanding Food Microbiology*. Nigeria: Alleluia Ventures Ltd, 2004.
- AG, R-Biopharm. *Good ELISA Practice*. Germany, 2015.
- Alcaide-Molina, M, J Ruiz-Jiménez, J Mata-Granados, e M Luque de Castro. "High through-put aflatoxin determination in plant material by automated solid-phase extraction on-line coupled to laser-induced fluorescence screening and determination by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry." *Journal of Chromatography*, 2009.
- Amado, M.A. "Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos: vantagens e inconveniente." *Revista Millenium*, 2002.
- Barkai-Golan, R, e N Paster. *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Copyright, 2008.
- Barna, V.I. "Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A." *Hournal of Agricultural and Food Chemistry* 1996.
- Beauchat, L.R. *Microbial Stability as affected by water activity*. Cereal Food World, 1981.
- Bellaver, C. "Utilização de grão na produção de carne suína de qualidade." *Revista Portworld*, 2004.
- Bennet, J.W, e M Klich. *Mycotoxins Clinical of Microbiology*. 2003.
- Betina, V. *Ochratoxins and related deiydroisocoumarins, Mycotoxins:Chemical biological and environmental aspects*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1989.
- Bezuidenhout, S.C, W.C.A Gelderblom, R.M Horak, W.F.O Marasas, e R Vleggaar. "Struture elucidation of the fumonisins, mycotoxins from Fusarium moniliforme." *Journal of Chemistry of the society of Chemical Community*, 1988.
- Bhat, R.V, e S Vasanthi. *Mycotoxin food safety risks in developing countries*. . Focus10, 2003.
- Bugno, A, A.A.B Almodovar, T.C Pereira, T.J Pinto, e M Sabina. *Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs*. Braz J. Microbiol, 2006.
- Bullerman, L.B, e L.L Schroeder. *Formation an control of mycotoxins in food*. J.Food Prot, 1984.
- Chakraborty, S, G.M Murray, P.A Magarey, T Yonow, R.G O'Brien, e B.J Croft. *Potencial impact of climate change on plant diseases of economic significance to Australia*. Australasian Plant Pathology, 1998.

- Creppy, E. *Human ochratoxicosis*. Journal of Toxicology and Toxins Review, 1999.
- Creppy, EE. *Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe*. Review. Toxicol Letters, 2002.
- Crowther, J.R. *The ELISA Guidebook*. Humana Press, 2001.
- Dhingra, O.D, e R.A Coelho. *Micotoxinas em grãos*. Revisão Anual de Patologia de Plantas: Passo Fundo, 1998.
- Dinis, S.P.S.S. *Micotoxinas*. Editora Rural, 2002.
- Dorner, J.W. *Management and prevention of mycotoxins in peanuts Food Additives & Contaminants*. London, 2005.
- Ellen, C.Hopmans. *Patulin: a Mycotoxin in Apples*. Department of Food Science & Technology, 1997.
- European Commission. Annual report, 2011.
- Feng, P. "Rapid methods for detecting foodborne pathogens." In *Food and Drug Administration*. AOAC International, 1995.
- Franco, B, e M Landgraf. *Microbiologia de Alimentos*. 1996.
- Frisvad, J,C, J Smedsgaard, R.A Samson, T.O Larsen, e U Thrane. *Fumonisin B2 production by Aspergillus niger*. J Agric Food Chem, 2007.
- Gilbert, J, e E.A Vargas. "Advances in Sampling and Analysis for Aflatoxins and Animal Feed." *Journal of Toxicology*, 2003.
- Gilbert, J, e HZ Enyuya. *Bioactive Compounds in Foods*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2008.
- Gimeno, A, e M.L Martins. *Resíduos de micotoxinas en leche, huevos y tejidos comestibles de aves, cerdos y rumiantes*. Albéitar, 2000.
- González, R.G. *Sflatoxins- Biochemistry and Molecular Biology*. InTech, 2011.
- Hocking, A.D, J.I Pitt, R.A Samson, e U Thrane. *Advances in Food Mycology*. Springer, 2006.
- Hussein, HS, e JM Brasel. *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animal*. Review Toxicology, 2001.
- Jay, J. *Microbiologia de Alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- . *Modern Food Microbiology: Mycotoxins*. International Thomson Publishers, 1997.
- Kabak, B, AD Dobson, e I Var. *Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review*. Food Sci Nutr, 2006.
- Khachatourians, G.G, e D.K Arora. *Applied Mycology and Biotechnology*. Elsevier Science, 2002.
- Khoury, A, e A Atoui. *Ochratoxin A: General Overview and Actua Molecular Status*. Toxins, 2010.
- Klich, MA. *Identificação de espécies comuns Aspergillus*. Holanda: CBS, 2002.

- Kovalsky, P. *Climate change and mycotoxin prevalence*. Broadening Horizons, 2014.
- Krska, R, H Pettersson, R.D Josephs, M Lemmens, S Mac Donald, e E Welzig. *Zearalenone in maize: stability testing and matrix characterisation of a certified reference material*. Food Addit Contam, 2003.
- Kwiatkowski, A, e A.P.F Alves. *Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos*. SaBios-Revista Saúde e Biologia, 2007.
- Magan, N, e M Olsen. *Mycotoxins in food :Detections and control*. Cambridge, Englad: Woodhead Publishing Ltd, 2004.
- Mendonça, C, L Abrunhosa, V Serra, e A Venâncio. “Contaminação fúngica das uvas e ocratoxina A em vinho.” Comunicado apresentado em conferência, FEUP, 2013.
- Motta, T.P, e K.M.R Duarte. *ELISA na detecção de aflatoxinas em alimentos*. Pubvet, 2010.
- Neal, G, e R Coker. *Metabolism and Toxicology of Mycotoxins*. Food Safety Proceedings Book, 2000.
- Newman, K. *The biochemistry behind esterified glucomannans- titrating mycotoxins out of the diet*. Proceedings, 2000.
- Nogueira, S, e M.B Oliveira. *Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de Segurança Alimentar*. Alimentação humana, 2006.
- Oancea, S, e M Stoia. *Mycotoxins: A review of toxicology, analytical methods and health risks*. Food Technology, 2008.
- O'Donnell, K, T.J Ward, D.M Geiser, H.C Kistler, e T Aoki. *Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the Fusarium graminearum clade*. Biol, 2004.
- Olga, S. “Fundamentos de toxicologia.” Atheneu, 1996.
- Pardo, E. *Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of Aspergillus ochraceus as affected by water activity and temperature on barleybased medium*. London: Food Microbiology, 2004.
- Park, K.Y, e L Bullerman. “Effects of substrate and temperature on aflatoxin production by Aspergillus parasiticus and Aspergillus flavus.” *J.Food Protect*, 1983.
- Paterson, R.R.M, e N Lima. “Further mycotoxin effects from climate change.” *Food Research International*, 2011.
- Paterson, R.R.M, e N Lima. *Mutagens affect food and water biodeteriorating fungi*. Elsevier, 2015.
- Pelczar, M.J, R Reid, e E.C.S Chan. “Microbiologia: conceitos e aplicações.” 1996.
- Pereira, V, J Fernandes, e S Cunha. “Micotoxinas em Portugal: Ocorrências e Toxicidade.” 2012.
- Pererson, S.W, Y Ito, B.W Horn, e T Goto. *Aspergillus bombycis, anew aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, A.nomius*. Mycologia, 2001.

- Pitt, J.I. *A laboratory guide to common Penicillium species*. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC, 2000.
- Pitt, J.I. "The significance of potentially toxigenic fungi in foods." In *Food Technol. Aust*, 1984.
- R-Biopharm. "Good ELISA Practice." Germany, 2015.
- R-Biopharm. "Ridascreen Aflatoxin B1 30/15 R1211."
- R-Biopharm. "Ridascreen Fast Aflatoxin SC R9002."
- R-Biopharm. "Ridascreen Fast Ochratoxin A R5402."
- R-Biopharm. "Ridascreen Ochratoxin A Columns R1303."
- Ribeiro, J, e A Coixão. "Aspectos etnográficos da cultura tradicional da amêndoa no Douro Superior." 2011.
- Rodrigues, P, A Venâncio, e N Lima. "Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins." *Food Research International*, 2012.
- Rodrigues, P, A Venâncio, Z Kozakiewicz, e N Lima. *A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non aflatoxigenic strains of Aspergillus Section Flavi isolated from Portuguese almonds*. Food microbiol, 2009.
- Rodrigues, P, C Soares, Z Kozakiewicz, R.R.M Paterson, N Lima, e A Venâncio. "Identifications and characterizations of Aspergillus flavus and aflatoxins." Institute for Biotechnology and Bioengineering, Universidade do Minho, 2007.
- Rustom, I.Y.S. *Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation, and inactivation by physical methods*. Food Chemistry, 1997.
- Scientific Committee on Food, SCF. *Opinion of the scientific committee on food on ochratoxin A*. European Commission. Brussels, Belgium: In Directorate- Scientific Opinions, 1998.
- Scott, P.M, e Lawrence. "Analysis of beer for fumonisins." *Journal Food Protection*, 1992.
- Scussel, Vildes Maria. *Micotoxinas em alimentos*. Florianópolis: Insular, 1998.
- Settaluri, V.S, C.V.K Kandala, N Puppala, e J Sundaram. *Peanuts and their nutritional aspects- A review*. Scientific Research, 2012.
- Shephard, G.S, et al. "Developments in mycotoxin analysis: an update for 2009-2010." *World Mycotoxin Journal*, 2011.
- Silva, J.S. *Secagem e armazenagem de produtos agrícolas*. Viçosa, 2008.
- Soares, C, L Abrunhosa, e A Venâncio. "Fungos produtores de micotoxinas." Institute for Biotechnologist and Bioengineering, Universidade do Minho, Braga, 2013.
- Strachan, N.J.C, P.G John, e I.G Millar. *Application of an automatic particlebased immunosensor for the detection of aflatoxin B1 in foods*. Food Agric Immunol, 1997.
- Stroka, J. *Determinations of Aflatoxins in Food and Feed with simple and optimised methods*. 2000.

Taniwaki, M, B Iamanaka, M.V Copetti, e L Paterno. "Ocratoxina em defeitos de cafés, cinética de destruição da toxina e avaliação das bebidas pelo uso da língua eletrônica." 2007.

Thomas, A. IARC. <https://www.iarc.fr/>.

Thomson, C, e S.E Henke. "Effects of climate and type of storage container on aflatoxin production in corn and its associated risks to wildlife species." *Journal of Wildlife Diseases* (Journal of Wildlife Diseases), 2000.

Venâncio, A, e RRP Paterson. "The challenge of Mycotoxins." In *In:Food Safety-A practical and case study approach*, Ch 2, 24-47. Springer, 2007.

Whitaker, T.B, e M Yamazaki. *Methods in Molecular Biology: Mycotoxin protocols*. Humana Press, 2001.

Whitlow, L.W, e W.M Hagler. "Mycotoxin Contamination of Feedstuffs- An Additional Stress Factor for Dairy Cattle." North Carolina State University, 2001.

Wogan, Gerald N. *Chemical Nature and Biological Effects of the Aflatoxins*. U.S.A: Copyright, 1966.

Zaki, M.M, S.A El-Midany, H.M Shaheen, e L Rizzi. "Mycotoxins in animal:Occurrence, effects, prevention and management." 2011.

Zeng, M.Z, J.L Richard, e J. Binder. *A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins*. Mycopathologia, 2006.

10. Anexos

10.1 Regulamentos aplicáveis

10.1.1 Secção 2 do Anexo do Regulamento (CE) N°1881/2006 da Comissão Europeia de 19 de Dezembro de 2006

Tabela 14 – Teores máximos de aflatoxinas e de ocratoxinas segundo a secção 2 do regulamento N°1881/2006 de 19 de Dezembro de 2006.

Géneros alimentícios (*)		Teores máximos (µg/kg)		
		B ₁	Somatório de B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	M ₁
2.1	Aflatoxinas			
2.1.1	Amendoins destinados a serem submetidos a um tratamento de triagem ou a outro tratamento físico antes de consumo humano ou utilização como ingrediente de géneros alimentícios	8,0 (‡)	15,0 (‡)	—
2.1.2	Frutos de casca rija destinados a serem submetidos a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes de consumo humano ou utilização como ingrediente de géneros alimentícios	5,0 (‡)	10,0 (‡)	—
2.1.3	Amendoins e frutos de casca rija e produtos derivados da sua transformação, destinados ao consumo humano directo ou como ingrediente de géneros alimentícios	2,0 (‡)	4,0 (‡)	—
2.1.4	Frutos secos destinados a serem submetidos a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes de consumo humano ou utilização como ingrediente de géneros alimentícios	5,0	10,0	—
2.1.5	Frutos secos e produtos derivados da sua transformação, destinados ao consumo humano directo ou como ingrediente de géneros alimentícios	2,0	4,0	—
2.1.6	Todos os cereais e produtos derivados de cereais, incluindo produtos derivados da sua transformação, com excepção dos géneros alimentícios referidos nos pontos 2.1.7, 2.1.10 e 2.1.12	2,0	4,0	—
2.1.7	Milho destinado a ser submetido a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes de consumo humano ou utilização como ingrediente de géneros alimentícios	5,0	10,0	—
2.1.8	Leite cru (¶), leite tratado termicamente e leite para o fabrico de produtos lácteos	—	—	0,050

(Continuação da tabela)

Géneros alimentícios ⁽¹⁾		Teores máximos (µg/kg)		
2.1.9	Especiarias das seguintes espécies: <i>Capsicum spp.</i> (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo a malagueta, a malagueta em pó, a pimenta de caiena e o pimentão-doce) <i>Piper spp.</i> (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada) <i>Zingiber officinale</i> (gengibre) <i>Curcuma longa</i> (curcuma)	5,0	10,0	—
2.1.10	Alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens ⁽²⁾ , ⁽⁷⁾	0,10	—	—
2.1.11	Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebés e leite de transição ⁽⁴⁾ ⁽⁸⁾	—	—	0,025
2.1.12	Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos ⁽⁹⁾ ⁽¹⁰⁾ especificamente destinados a lactentes	0,10	—	0,025
2.2	Ocratoxina A			
2.2.1	Cereais não transformados	5,0		
2.2.2	Todos os produtos derivados de cereais não transformados, incluindo produtos à base de cereais transformados e cereais destinados ao consumo humano directo, com excepção dos géneros alimentícios referidos nos pontos 2.2.9 e 2.2.10	3,0		
2.2.3	Passas de uvas (uvas de Corinto, uvas e sultanas)	10,0		
2.2.4	Café torrado, moido ou em grão, com excepção do café solúvel	5,0		
2.2.5	Café solúvel (café instantâneo)	10,0		
2.2.6	Vinho (incluindo vinho espumante e excluindo vinho licoroso e vinho com teor alcoométrico não inferior a 15 % vol.) e vinho de frutos ⁽¹¹⁾	2,0 ⁽¹²⁾		
2.2.7	Vinho aromatizado, bebidas aromatizadas à base de vinho e cocktails aromatizados de produtos vitivinícolas ⁽¹³⁾	2,0 ⁽¹²⁾		
2.2.8	Sumo de uva, concentrado de uva reconstituído, néctar de uva, mosto de uva e concentrado de mosto reconstituído, destinados ao consumo humano directo ⁽¹⁴⁾	2,0 ⁽¹²⁾		
2.2.9	Alimentos à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens ⁽²⁾ ⁽⁷⁾	0,50		
2.2.10	Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos ⁽⁹⁾ ⁽¹⁰⁾ especificamente destinados a lactentes	0,50		
2.2.11	Café verde, frutos secos que não uva passa, cerveja, cacau e produtos derivados do cacau, vinhos licorosos, produtos à base de carne, especiarias e alcaçuz	—		

Anexo do Regulamento (CE) Nº 165/2010 da Comissão Europeia de 26 de Fevereiro de 2010

Tabela 15 – Teores máximos de aflatoxinas segundo o regulamento Nº165/2010 de 26 de Fevereiro de 2010.

Géneros alimentícios ⁽¹⁾		Teores máximos (µg/kg)		
•2.1	Aflatoxinas	B ₁	Somatório de B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	M ₁
2.1.1.	Amendoins e outras sementes oleaginosas ⁽⁴⁰⁾ destinados a serem submetidos a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes do seu consumo humano ou da sua utilização como ingrediente em géneros alimentícios, com excepção de: — amendoins e outras sementes oleaginosas destinados a serem triturados para a produção de óleo vegetal refinado	8,0 ⁽⁵⁾	15,0 ⁽⁵⁾	—
2.1.2.	Amendoins, pistácios e caroços de alperce destinados a serem submetidos a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes do seu consumo humano ou da sua utilização como ingrediente em géneros alimentícios	12,0 ⁽⁵⁾	15,0 ⁽⁵⁾	—
2.1.3.	Avelãs e castanhas do Brasil destinadas a serem submetidas a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes do seu consumo humano ou da sua utilização como ingrediente em géneros alimentícios	8,0 ⁽⁵⁾	15,0 ⁽⁵⁾	—
2.1.4.	Frutos de casca rija, à excepção dos enumerados nos pontos 2.1.2 e 2.1.3, destinados a serem submetidos a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes do seu consumo humano ou da sua utilização como ingrediente em géneros alimentícios	5,0 ⁽⁵⁾	10,0 ⁽⁵⁾	—
2.1.5.	Amendoins e outras sementes oleaginosas ⁽⁴⁰⁾ e produtos derivados da sua transformação, destinados ao consumo humano directo ou à utilização como ingrediente em géneros alimentícios, com excepção de: — óleos vegetais brutos destinados à refinação, — óleos vegetais refinados	2,0 ⁽⁵⁾	4,0 ⁽⁵⁾	—
2.1.6.	Amendoins, pistácios e caroços de alperce destinados ao consumo humano directo ou à utilização como ingrediente em géneros alimentícios ⁽⁴¹⁾	8,0 ⁽⁵⁾	10,0 ⁽⁵⁾	—
2.1.7.	Avelãs e castanhas do Brasil destinadas ao consumo humano directo ou à utilização como ingrediente em géneros alimentícios ⁽⁴¹⁾	5,0 ⁽⁵⁾	10,0 ⁽⁵⁾	—
2.1.8.	Frutos de casca rija, à excepção dos enumerados nos pontos 2.1.6 e 2.1.7, e produtos derivados da sua transformação, destinados ao consumo humano directo ou à utilização como ingrediente em géneros alimentícios	2,0 ⁽⁵⁾	4,0 ⁽⁵⁾	—
2.1.9.	Frutos secos destinados a serem submetidos a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes do seu consumo humano ou da sua utilização como ingrediente em géneros alimentícios	5,0	10,0	—
2.1.10.	Frutos secos e produtos derivados da sua transformação destinados ao consumo humano directo ou à utilização como ingrediente em géneros alimentícios	2,0	4,0	—
2.1.11.	Todos os cereais e produtos derivados de cereais, incluindo produtos derivados da sua transformação, com excepção dos géneros alimentícios referidos nos pontos 2.1.12, 2.1.15 e 2.1.17	2,0	4,0	—

Curvas de calibração das aflatoxinas totais, aflatoxina B₁ e ocratoxina A

10.1.2 Curva de calibração das aflatoxinas totais

A determinação das aflatoxinas totais foi efetuada utilizando o *kit RidascreenFast AflatoxinSC (R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha)*. Este *kit* contém um certificado de qualidade que permite a construção de curvas de calibração usando apenas uma solução padrão de concentração 0 ppb, através dos dados da tabela seguinte.

Tabela 16 – Valores retirados do certificado de qualidade do *kit* das aflatoxinas totais para construção da curva de calibração.

Concentração (ppb)	Absorvância	$\frac{B}{B_0}$ (%)
0,00	1,248	100,00
2,00	1,062	85,10
4,00	0,943	75,60
10,00	0,749	60,00
20,00	0,559	44,80
50,00	0,298	23,90
100,00	0,178	14,30

Na tabela acima, o valor de B₀ (1,248) corresponde à absorvância obtida para a concentração de 0 ppb em condições ótimas e o valor B corresponde à absorvância em cada ponto.

Na tabela seguinte são apresentados os dados obtidos para a absorvância, assim como os valores de concentração calculados para as análises efetuadas.

Tabela 17 – Valores de absorvâncias obtidas e concentrações calculadas através dos valores percentuais $\frac{B}{B_0}$ fornecidos no certificado de qualidade.

Conc (ppb)	$\frac{B}{B_0}$ (%)	Curvas de calibração																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
0,000		1,145	0,787	1,015	1,106	0,980	0,978	0,925	0,632	0,902	0,798	0,853	0,856	0,816	0,801	0,759	0,702	0,865	0,893
2,000	85,1	0,974	0,670	0,864	0,941	0,834	0,832	0,787	0,538	0,768	0,679	0,726	0,728	0,694	0,682	0,646	0,597	0,736	0,760
4,000	75,6	0,866	0,595	0,767	0,836	0,741	0,739	0,699	0,478	0,682	0,603	0,645	0,647	0,617	0,606	0,574	0,531	0,654	0,675
10,000	60,0	0,687	0,472	0,609	0,664	0,588	0,587	0,555	0,379	0,541	0,479	0,512	0,514	0,490	0,481	0,455	0,421	0,519	0,536
20,000	44,8	0,513	0,353	0,455	0,495	0,439	0,438	0,414	0,283	0,404	0,358	0,382	0,383	0,366	0,359	0,340	0,314	0,388	0,400
50,000	23,9	0,274	0,188	0,243	0,264	0,234	0,234	0,221	0,151	0,216	0,191	0,204	0,205	0,195	0,191	0,181	0,168	0,207	0,213
100,000	14,3	0,164	0,113	0,145	0,158	0,140	0,140	0,132	0,090	0,129	0,114	0,122	0,122	0,117	0,115	0,109	0,100	0,124	0,128

As curvas de calibração utilizadas são do tipo Logit/Log, ou seja, no eixo das ordenadas está representado o logaritmo da concentração e no eixo das abcissas está representado o Logit das absorvâncias. O valor Logit tem a seguinte equação:

$$\text{Logit} = \text{Ln} \frac{\frac{B}{B_0}}{1 - \frac{B}{B_0}} \quad (1)$$

Uma vez que o valor $\frac{B}{B_0}$ é igual para todas as curvas, o gráfico de calibração para este *kit* será também o mesmo. Os valores utilizados para traçar a reta de calibração encontram-se de seguida.

Tabela 18 – Valores de Logit e de Log para a construção da curva de calibração das aflatoxinas totais.

Concentração (ppb)	Log (concentração)	$\frac{B}{B_0}$ (%)	Logit (Absorvância)
2,00	0,30	85,10	1,74
4,00	0,60	75,60	1,13
10,00	1,00	60,00	0,41
20,00	1,30	44,80	-0,21
50,00	1,70	23,9	-1,16
100,00	2,00	14,3	-1,79

Na figura seguinte é representada a curva de calibração das aflatoxinas totais. Uma vez que o logaritmo de 0 é um número indefinido, a representação da concentração desse valor numa escala logarítmica não é possível.

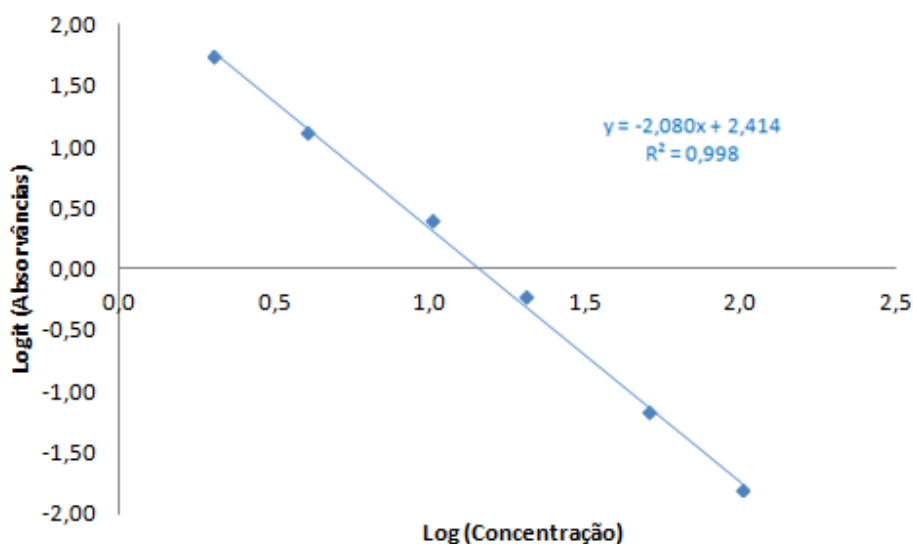


Figura 27 – Representação gráfica da curva de calibração das aflatoxinas totais.

As seguintes tabelas apresentam os resultados de absorvâncias que se obtiveram para os produtos fritos torrados e para as amêndoas.

Tabela 19 Valores das absorvâncias obtidas para os produtos fritos (caju e amendoim), antes (1) e após (2) a fritura.

Lote	Origem	Logit 1	Absorvância obtida		Absorvância padrão		Logit 2	Absorvância obtida		Absorvância padrão	
			1	2	1	2		1	2	1	2
Produto frito: Caju											
1046	Vietname	1,952	0,782	0,893	2,512	0,826	0,893	0,893	0,893		
1386	Índia	5,858	0,700	0,702	2,675	0,798	0,853	0,853	0,853		
1036	Vietname	2,817	0,753	0,798	3,052	0,762	0,798	0,798	0,798		
1816	Vietname	2,016	0,796	0,902	3,149	0,606	0,632	0,632	0,632		
1826	Vietname	1,984	0,793	0,902	2,292	0,574	0,632	0,632	0,632		
1646	Vietname	2,089	0,759	0,853							
1986	Índia	2,228	0,835	0,925							
2226	Vietname	2,135	0,989	1,106							
2236	Vietname	2,016	0,976	1,106							
Produto frito: Amendoim											
1096	Brasil	1,95	0,782	0,893	3,36	0,863	0,893	0,893	0,893		
1376	Brasil	2,32	0,639	0,702	3,06	0,765	0,801	0,801	0,801		
1656	Argentina	1,79	0,731	0,853	3,44	0,874	0,902	0,902	0,902		
1766	Argentina	1,89	0,784	0,902	3,37	0,872	0,902	0,902	0,902		
1776	Argentina	2,16	0,809	0,902	2,90	0,599	0,632	0,632	0,632		
1936	Brasil	2,47	0,853	0,925	2,67	0,865	0,925	0,925	0,925		
2266	Brasil	1,50	0,905	1,106	3,56	0,987	1,015	1,015	1,015		
2286	Brasil	2,05	0,899	1,015							
2826	Brasil	1,92	0,686	0,787							
2936	Brasil	2,53	0,729	0,787							

Tabela 20 Valores das absorvâncias obtidas dos produtos torrados (Amendoim e pistacho) antes (1) e após (2) torra.

Lote	Origem	Logit 1	Absorvância obtida		Absorvância padrão		Logit 2	Absorvância obtida		Absorvância padrão	
			1	2	1	2		1	2	1	2
Produto torrado: Amendoim com casca											
1126	EUA	1,770	0,763	0,893	0,893	1,994	0,786	0,893	0,893	0,902	0,893
1316	EUA	1,603	0,720	0,865	0,865	3,271	0,869	0,865	0,865	0,865	0,865
1306	EUA	1,514	0,709	0,865	0,865	2,035	0,765	0,865	0,865	0,865	0,865
1436	China	2,051	0,723	0,816	0,816	3,329	0,893	0,816	0,816	0,816	0,816
1486	EUA	2,795	0,769	0,816	0,816	2,585	0,796	0,816	0,816	0,816	0,816
2296	EUA	1,816	0,873	1,015	1,015	4,426	1,003	1,015	1,015	1,015	1,015
1426	China	1,848	0,692	0,801	0,801			0,801	0,801	0,801	0,801
1346	EUA	2,069	0,768	0,865	0,865			0,865	0,865	0,865	0,865
2166	EUA	1,567	0,915	1,106	1,106			1,106	1,106	1,106	1,106
2276	EUA	1,837	0,954	1,106	1,106			1,106	1,106	1,106	1,106
2416	China	2,785	0,956	1,015	1,015			1,015	1,015	1,015	1,015
3136	China	1,979	1,006	1,145	1,145			1,145	1,145	1,145	1,145
Produto torrado: Pistacho											
1176	Irão	2,105	0,796	0,893	0,893	2,561	0,803	0,893	0,893	0,865	0,865
0416	Irão	2,340	0,789	0,865	0,865	2,445	0,796	0,865	0,865	0,865	0,865
1636	Espanha	1,967	0,751	0,856	0,856	2,114	0,712	0,856	0,856	0,798	0,798
0316	Irão	1,482	0,797	0,978	0,978	2,045	0,866	0,978	0,978	0,978	0,978
1166	Irão	2,026	0,789	0,893	0,893			0,893	0,893	0,893	0,893
2216	Espanha	1,829	0,953	1,106	1,106			1,106	1,106	1,106	1,106
3016	Espanha	1,882	0,683	0,787	0,787			0,787	0,787	0,787	0,787
3026	Irão	2,151	0,705	0,787	0,787			0,787	0,787	0,787	0,787
3116	Irão	2,616	1,067	1,145	1,145			1,145	1,145	1,145	1,145

Tabela 21 Valores de absorvências obtidas para as amêndoas transformadas, antes (1) e após (2) a transformação.

Lote	Origem	Logit 1	Absorvência obtida 1	Absorvência padrão 1	Logit 2	Absorvência obtida 2	Absorvência padrão 2
1256	EUA	2,528	0,827	0,893	5,162	0,698	0,702
1266	EUA	2,140	0,799	0,893	2,530	0,703	0,759
1446	EUA	1,827	0,69	0,801	2,947	0,857	0,902
1546	EUA	2,076	0,869	0,978	2,564	0,792	0,853
2046	EUA	0,799	0,676	0,98	2,019	0,896	1,015
1556	EUA	2,474	0,902	0,978			
1356	EUA	2,596	0,805	0,865			
1786	EUA	2,289	0,819	0,902			
1796	EUA	2,116	0,805	0,902			
1806	EUA	2,049	0,799	0,902			
1966	EUA	1,469	0,752	0,925			
2026	EUA	2,462	0,903	0,98			
2036	EUA	1,932	0,856	0,98			

Tabela 22 Valores de absorvâncias obtidas para as amêndoas sem transformação.

Lote	Origem	Logit1	Absorvância obtida 1	Absorvância padrão 1
1586	EUA	2,479	0,787	0,853
1596	EUA	1,466	0,693	0,853
1396	EUA	1,733	0,645	0,759
1416	EUA	4,832	0,753	0,759
1406	EUA	2,437	0,698	0,759
1466	EUA	3,567	0,779	0,801
1476	EUA	1,817	0,689	0,801
1456	EUA	3,717	0,782	0,801
1886	EUA	0,724	0,623	0,925
1906	EUA	2,927	0,878	0,925
1896	EUA	3,584	0,900	0,925
1926	EUA	2,781	0,871	0,925
1916	EUA	4,742	0,917	0,925
2066	EUA	1,526	0,805	0,98
2056	EUA	0,814	0,679	0,98

10.1.3 Curva de calibração da aflatoxina B₁

A determinação da aflatoxina B₁ foi efetuada utilizando o kit *Ridascreen Aflatoxin B1 30/15* (R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha). Para a determinação das concentrações foram realizados dois ensaios, tendo sido, por isso, utilizadas duas curvas de calibração. Os resultados das curvas de calibração são apresentados na seguinte tabela.

Tabela 23 – Valores de absorvâncias obtidas para o cálculo do Logit com a finalidade de obter as curvas de calibração.

Conc (ppb)	Absorvâncias		LogConc	Logit	
	Curva 1	Curva 2		Curva 1	Curva 2
0	1,406	1,432	-	-	-
1	1,199	1,277	0	1,757	2,109
5	0,967	1,005	0,699	0,790	0,856
10	0,802	0,893	1,000	0,284	0,505
20	0,675	0,715	1,301	-0,080	-0,003
50	0,503	0,488	1,699	-0,585	-0,660

Com os valores da tabela acima, foi possível a construção das duas curvas de calibração.

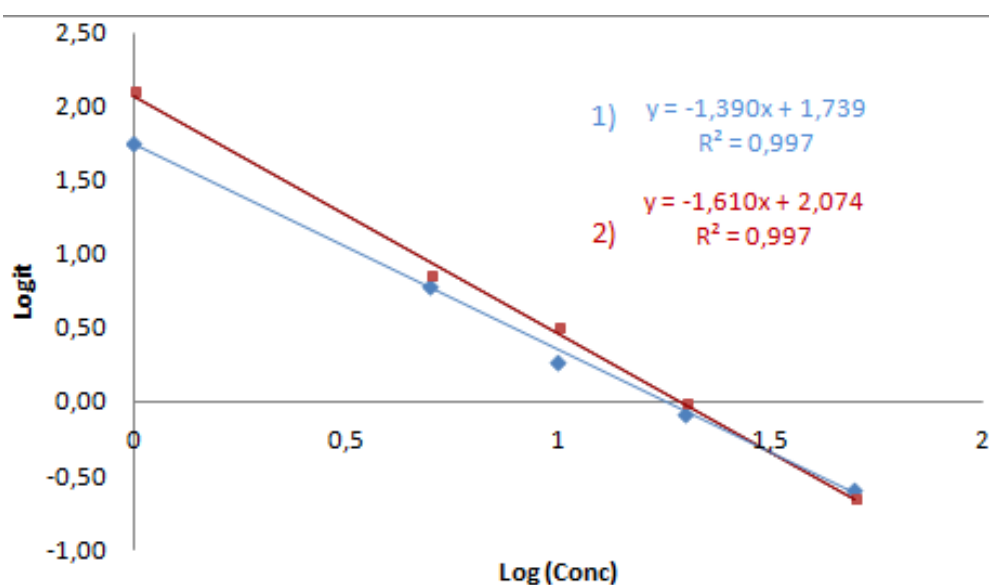


Figura 28 – Curvas de calibração obtidas para o teste da aflatoxina B₁.

Através das curvas de calibração foi possível obter o valor da concentração pelo mesmo método das aflatoxinas, ou seja, substituindo nas expressões os respectivos parâmetros.

A tabela seguinte apresenta as curvas de calibração utilizadas para cada produto alimentar.

Tabela 24 – Curva de calibração utilizada para cada produto alimentar.

Produto	Lote	Curva de calibração
Amendoim com casca	1316	y=-1,390x+1,739
Amendoim com casca	1306	
Amêndoa laminada	1396	
Farinha de amêndoa	1596	
Pistacho cru	0316	
Amêndoa granulada	1886	
Amêndoa	1966	
Amêndoa	2046	
Farinha de amêndoa	2056	
Amêndoa laminada	2066	
Amendoim com casca	2166	
Amendoim despelado	2266	

De referir que o valor de B_0 para a curva 1 é 1,406 e para a curva 2 o valor é 1,432.

Os valores de absorvâncias obtidos para os produtos analisados para as AFB1 encontram-se de seguida.

Tabela 25 Valores de absorvâncias para os produtos analisados.

Produto	Lote	Origem	Logit	Absorvâncias
Amendoim com casca	1316	EUA	2,125	1,256
Amendoim com casca	1306	EUA	2,284	1,276
Amêndoa laminada	1396	EUA	2,497	1,299
Farinha de amêndoa	1596	EUA	2,486	1,298
Pistacho cru	0316	Irão	4,530	1,391
Amêndoa granulada	1886	EUA	0,790	0,967
Amêndoa	1966	EUA	2,025	1,265
Amêndoa	2046	EUA	1,628	1,197
Farinha de Amêndoa	2056	EUA	1,588	1,189
Amêndoa laminada	2066	EUA	3,014	1,365
Amendoim com casca	2166	EUA	2,279	1,299
Amendoim despelado	2266	Brasil	3,046	1,367

10.1.4 Curvas de calibração da ocratoxina A

A determinação das aflatoxinas totais foi efetuada utilizando o *kit Ridascreen Fast Ochratoxin A (R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha)*. Foram realizadas quatro curvas de calibração correspondentes aos quatro produtos analisados. Os resultados das curvas de calibração, e os valores calculados para a concentração da ocratoxina A nos ensaios realizados, são apresentados na seguinte tabela.

Tabela 26 – Valores de absorvâncias obtidas para o cálculo do Logit com a finalidade de obter as curvas de calibração.

Conc. (ppb)	Absorvâncias				Log (Conc)	Logit			
	1	2	3	4		1	2	3	4
0	1,405	1,643	1,491	1,564	-	-	-	-	-
5	1,21	1,383	1,126	1,132	0,699	1,825	1,671	1,127	0,963
10	1,03	1,174	1,007	0,989	1	1,010	0,918	0,733	0,542
20	0,813	1,018	0,753	0,758	1,301	0,317	0,488	0,020	-0,061
40	0,558	0,644	0,568	0,507	1,602	-0,417	-0,439	-0,486	-0,735

Com os valores obtidos anteriormente traçaram-se as curvas de calibração para cada ensaio, que se encontram representadas na figura seguinte.

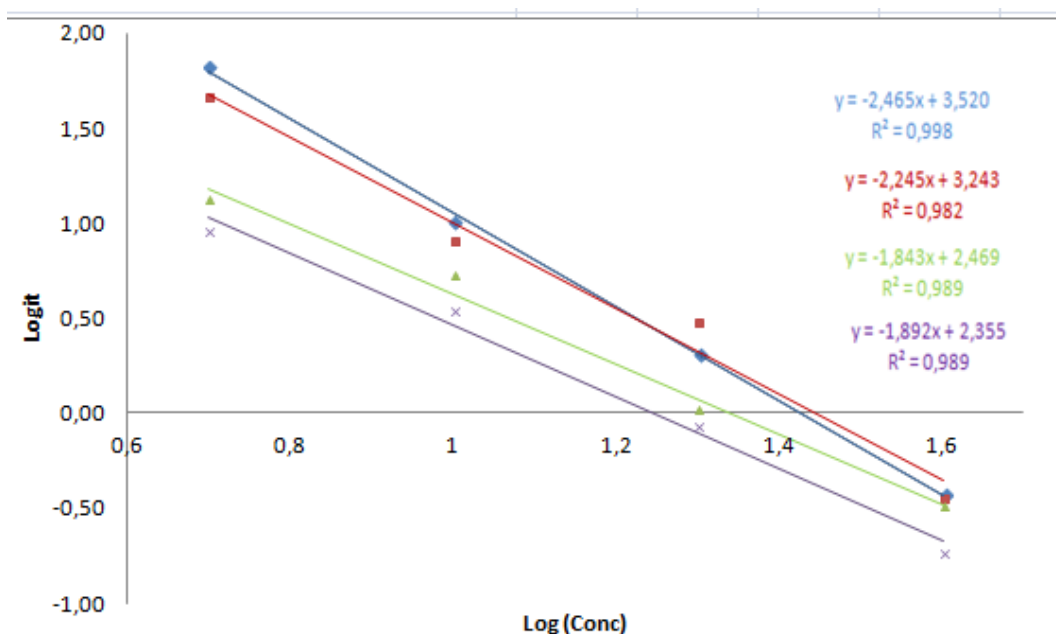


Figura 29 – Curvas de calibração obtidas para os ensaios realizados para o teste da ocratoxina A.

Através das expressões das curvas foi possível obter o valor da concentração, substituindo nas expressões os respectivos parâmetros. A tabela seguinte apresenta as curvas de calibração utilizadas para cada produto alimentar.

Tabela 27 – Curva de calibração utilizada para o respetivo produto.

Produto	Lote	Curva de calibração
Passa de uva	1716	$Y=-2,465x+3,520$
Sultana	1866	$Y=-2,245x+3,243$
Sultana	2246	$Y=-1,843x+2,469$
Corintos	2586	$Y=-1,892x+2,355$

A seguinte tabela apresenta os valores de absorvâncias obtidos para os produtos analisados para a OTA.

Tabela 28 Valores de absorvâncias para os produtos analisados.

Produto	Lote	Origem	Absorvância obtidas
Passa de uva	1716	África do sul	1,319
Sultana	1866	Turquia	1,528
Sultana	2246	Turquia	1,261
Corintos	2586	Grécia	1,376

10.1.5 Contagem de bolores e leveduras

De acordo com a norma ISO 7954 o cálculo para o número de bolores e leveduras por grama de produto tem a seguinte expressão:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) d} \quad (1)$$

Onde:

$\sum C$ é o somatório das colónias em cada placa

n_1 e n_2 é número de placas da primeira diluição e da segunda diluição, respetivamente
d diluição que foram obtidas as primeiras contagens

Substituindo os valores obtidos na expressão temos que:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) d} = \frac{15+16+5+8}{(2+0,1 \times 2) \times 10^{-2}} = \frac{44}{0,022} = 2000$$