



Maria do Rosário Pereira de Carvalho

Esterigmatocistina em Cereais e Derivados

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Celeste de Matos Lino e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria do Rosário Pereira de Carvalho

Esterigmatocistina em Cereais e Derivados

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Celeste de Matos Lino e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Junho de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Maria do Rosário Pereira de Carvalho, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2010145437, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 29 de junho de 2016.

(Maria do Rosário Pereira de Carvalho)

A Tutora

(Professora Doutora Celeste de Matos Lino)

A Aluna

(Maria do Rosário Pereira de Carvalho)

Agradecimentos

“Lembrar-vos-eis um pouco do que ouvistes, muito do que lestes, mais do que vistes e, sobretudo, do que experimentastes e amplamente compreendestes.”
(Keith L. Moore)

À minha prezada orientadora, Professora Celeste Lino, pela simpatia, pela ajuda, pela atenção e pela compreensão constantes e por todos os ensinamentos. Muito obrigada,
Professora.

A todos os Professores e Professoras da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelo esforço e dedicação na transmissão de conhecimentos.

A todos os auxiliares da minha Faculdade de Farmácia, pela simpatia que me dedicaram.

A todos os meus amigos, pelo caloroso aconchego com que sempre me acolheram e por me terem feito viver Coimbra.

A Coimbra... por me ter dado asas!

“Ninguém vence sozinho, nem no campo, nem na vida!”
(Papa Francisco)

Aos meus pais, à minha irmã e ao meu namorado, por serem os melhores do mundo. Obrigada por nunca terem duvidado de mim e das minhas capacidades. Obrigada por nunca terem permitido que desistisse deste curso, que é, hoje, um grande motivo de felicidade para mim. Obrigada por me terem encorajado a viver e a desvendar todo este sonho (que o não era...) que se materializa numa apaixonante realidade. Sou muito feliz, graças a vós!

Obrigada por serdes!

E, por fim, ao meu Grande e Maravilhoso Amigo, obrigada por Teres caminhado, sempre de mãos dadas, comigo. Por me Teres feito acreditar, com todas as minhas forças, que nada acontece por acaso. A Ti, o meu maior Obrigada!

Índice

Abreviaturas	1
Resumo	2
Abstract	3
1. Introdução	4
2. Micotoxinas	6
3. Esterigmatocistina	7
3.1 Características físico-químicas.....	7
3.2 Toxicocinética	8
3.3 Incidência.....	9
3.4 Metodologias Analíticas.....	10
3.5 Reflexão da análise/interpretação dos resultados.....	13
4. Conclusão	15
Bibliografia	17

Abreviaturas

APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

DNA – *Ácido Desoxirribonucleico*

ELISA – *Enzime-linked Immunosorbent Assay*

ESI – *Ion Spray Eletrospray Ionization*

UE – *União Europeia*

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FLD – *Fluorimetric Detection*

GC-MS – *Gas Chromatography Mass Spectrometry*

GSH – *Glutathione*

HPLC – *High-performance liquid chromatography*

IAC – *Immunoaffinity Column*

IARC – *Internacional Agency for Research on Cancer*

JECFA – *Join Expert Committee on Food Additives*

LC-MS – *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

WHO – *World Health Organization*

SPE – *Solid-Phase Extraction*

STC – *Esterigmatocistina*

UV – *Ultravioleta*

Resumo

O conhecimento atual é fruto da necessidade que o Homem tem de compreender o Mundo. A Natureza e a Sociedade estão em constante evolução e transformação, daí que o conhecimento seja sempre momentâneo e, de certo modo, volátil. O que hoje é comumente aceite pode deixar de o ser, num futuro bem próximo. A ciência é dinâmica graças à investigação, procura a cada dia ampliar o conhecimento do universo, das relações e das interações que ocorrem. No âmbito do MICE, a investigação assume uma importância vital, pois dela depende a saúde e o bem-estar das populações. O presente trabalho pretende ser um pequeno contributo para o conhecimento de uma micotoxina, a esterigmatocistina (STC), ainda pouco estudada, investigando a sua incidência nos cereais e derivados e as implicações da sua presença, para os animais e para o homem.

Lançando mão de alguns artigos científicos, dão-se a conhecer as características físico-químicas da esterigmatocistina, a toxicocinética da molécula, a incidência da micotoxina em cereais e derivados e as metodologias analíticas requeridas para o seu registo.

Constata-se que existem, ou foram divulgados, ainda poucos estudos científicos sobre a micotoxina em apreço. Não obstante, estes permitem afirmar que, mesmo sendo um tóxico potente que apresenta carcinogénese em animais, a sua influência nos humanos não é ainda conhecida, sabendo-se apenas que é menos tóxica que as aflatoxinas. Porém, foram observadas neoplasias, após administração oral: carcinomas hepatocelulares e adenomas pulmonares. A esterigmatocistina foi, em 1987, considerada pela IARC como pertencente ao grupo 2B, possivelmente carcinogénica para o Homem, por via da evidência de poder causar cancro. Os estudos realizados não são conclusivos, pelo que é necessário um melhor e mais profundo conhecimento dos seus efeitos.

Apesar desta situação, nenhuma entidade quer europeia quer internacional estabeleceu limites máximos para a STC nos alimentos. É, pois, urgente que se invista mais no conhecimento da ocorrência da STC e também na investigação e na procura de métodos analíticos que permitam analisar amostras de alimentos.

Abstract

The current knowledge that man has, is the result of the necessity to understand the world. Nature and Society are in constant evolution and transformation, so that knowledge is always momentary and, in a way, volatile. What is now commonly accepted may cease to be in the near future. Science is dynamic through research, which every day attempts to expand the knowledge of the universe, the relationships and interactions that occur. In the MICF, research is of importance, because it determines the health and well-being of the population. This work intends to be a small contribution to the knowledge of a mycotoxin, the sterigmatocystin (STC), still little studied, investigating its impact on cereals and derivatives and the implications of its presence, on animals and humans.

Using some scientific articles, the physicochemical characteristics of sterigmatocystin, toxicokinetics of the molecule, the incidence of mycotoxin in cereals and derivatives and analytical methodologies required for registration are presented in this paper.

It appears that there are, or were released, few scientific studies on the mycotoxin in question. Nevertheless, these articles allow us to state that even though it is a potent toxic presenting carcinogenesis in animals, their influence on humans is not yet known, knowing only that it is less toxic than aflatoxins. However, tumors were observed after oral administration: hepatocellular carcinoma and pulmonary adenomas. The sterigmatocystin was in 1987 considered by IARC as belonging to the group 2B, possibly carcinogenic to humans, through the evidence that it could cause cancer. The studies are not conclusive, better and deeper understanding of its effects is necessary.

In spite of this, no organization, European or International, has so far established maximum limits for the STC in food. It is therefore urgent to invest more in knowledge of the occurrence of STC and also in the research for analytical methods to analyze food samples.

I. Introdução

O presente trabalho constitui uma abordagem a uma micotoxina ainda pouco estudada, a esterigmatocistina. Resulta da pesquisa e da análise de uma conjugação de vários estudos já realizados em diversos países. Pretende proporcionar um momento de reflexão sobre o que se conhece e os métodos utilizados na deteção desta micotoxina, em cereais e nos seus derivados.

Os cereais foram as primeiras espécies vegetais a serem cultivadas, durante muitos anos, pelo Homem, a nível global. Atualmente, muitas espécies de cereais e respetivos derivados têm proliferado por todo o mundo, particularmente o trigo, o arroz e o milho. Também a cevada, a aveia e o centeio têm conhecido uma ascensão significativa na sua produção e consumo (Pereira, Fernandes e Cunha, 2014).

Estes alimentos são constituídos por hidratos de carbono, proteínas, ácidos gordos essenciais, vitaminas do complexo B, vitamina E, ferro, entre outros nutrientes. Também são encontrados, na sua composição, vestígios de outros cereais, fitoquímicos e fibras (Pereira, Fernandes e Cunha, 2014).

A partir dos anos 60 do século passado, o Homem tem aumentado a produção de cereais em biliões de toneladas (FAO, 2002), o que implica que, para assegurar a composição de todos os cereais e manter a sua segurança em todas as etapas de sementeira, crescimento, colheita, armazenamento, transporte e processamento, sejam necessários métodos específicos e precisos (Hossain e Goto, 2014; Sharma e Sumbali, 2014).

Desde sempre que os cereais são consumidos em grande quantidade, em todo o mundo, e cada vez são mais abrangentes e exigentes os critérios de qualidade, procurando tornar diminutos os erros. A vigilância em todos os processos de produção dos cereais afigura-se cada vez mais como fundamental, para evitar, na tentativa de erradicar, a existência de contaminantes de várias naturezas (Pereira, Fernandes e Cunha, 2014).

Segundo Zheng *et al.* (2014), as alterações, ainda que ténues, no grau de humidade e de temperatura, bem como no tempo de armazenagem, na presença de oxigénio ou de dióxido de carbono nas interações microbiológicas, entre outros fatores, podem ser responsáveis pela ocorrência de contaminações.

Um contaminante, segundo a United Nations Goflex Committee on Food Additives and Contaminants, é qualquer substância adicionada, não intencionalmente, e que está presente num alimento, como resultado da produção (incluindo operações efetuadas na prática agrícola ou animal, bem como na medicina veterinária), da manufatura, do processamento, da preparação, do tratamento, do acondicionamento, do transporte ou da

conservação desse alimento, ou como resultado de uma contaminação ambiental ou da sua produção por um organismo vivo.

Quando se trata da segurança alimentar, os fungos adquirem particular importância, uma vez que interferem diretamente quer na saúde humana quer na saúde animal. Estes são seres vivos ubíquos na Terra uma vez que nascem e desenvolvem-se, sem dificuldades, em ambientes húmidos e quentes e em múltiplos hospedeiros (Zheng *et al.*, 2014).

É durante o ciclo de vida do fungo que ocorre a produção de metabolitos tóxicos secundários, as denominadas micotoxinas. Segundo os dados da FAO, em 2013, foi estimado que, atualmente, 25 % dos alimentos se encontram contaminados com micotoxinas (FAO, 2013; Pereira, Fernandes e Cunha, 2014).

Os fungos são omnipresentes na natureza e suscitam problemas de importância diversa em variados setores das atividades humanas. Quando contaminam alimentos, podem causar envenenamentos, intoxicações alimentares, alergias, entre outras patologias. No entanto, nem todos os fungos acarretam malefícios para a saúde. Alguns participam na biossíntese de antimicrobianos, na fermentação biológica de géneros alimentícios e outros são, por si só, alimentos (Actor; Goering *et al.*). Por isto mesmo, importa ter em atenção a correta identificação do fungo e possíveis metabolitos que possam surgir da sua biotransformação, como é o caso das micotoxinas (Ates *et al.*, 2014).

A quantificação destes compostos tem sido feita em vários géneros alimentícios, incluindo os cereais. De entre a instrumentação analítica existente que permite detetar e quantificar as micotoxinas nos cereais e derivados, salienta-se a cromatografia líquida e gasosa, com deteção por espectrometria de massa (Sasaki *et al.*, 2014).

Na prossecução destes princípios, o presente estudo divide-se em duas partes distintas, necessariamente complementares. Na primeira parte, apresenta-se a micotoxina sobre a qual incide o estudo, a esterigmatocistina, e são dadas a conhecer as suas características físico-químicas bem como a toxicocinética da molécula. Na segunda, dá-se relevo à incidência da micotoxina em cereais e seus derivados, já registada em várias publicações científicas, até aos dias de hoje, assim como às metodologias analíticas requeridas para a sua deteção e quantificação e é feita uma análise e uma interpretação dos resultados do trabalho investigativo.

2. Micotoxinas

O termo micotoxina tem origem greco-latina, derivando “fungo” do termo grego *Mykes* e “toxina” da palavra latina *Toxicum*. São, então, metabolitos secundários produzidos por fungos que surgem naturalmente como contaminantes de produtos agrícolas e que demonstram toxicidade quando ingeridos por uma via natural, essencialmente por via oral, através dos alimentos (Hashchek e Voss).

Estes metabolitos têm sido reconhecidos como causadores de problemas *major* de saúde e, conseqüentemente, de problemas económicos. A preocupação com a presença de micotoxinas em alimentos e as suas implicações na saúde tem vindo a aumentar, à medida que se foram descobrindo novas micotoxinas e se reuniram dados sobre a sua ocorrência natural em alimentos e a respetiva toxicidade em animais. Acresce aos casos de intoxicações agudas que são atribuídos à sua ingestão, a possibilidade de também lhe serem acometidos efeitos crónicos. Com o intuito de melhor conhecer para mais assertivamente atuar, entidades como a JECFA, a WHO e a FAO, à escala mundial, são responsáveis pela avaliação dos riscos associados ao consumo de micotoxinas. Na UE, a autoridade que regulamenta e controla estes processos é a EFSA (Pereira, Fernandes e Cunha, 2014).

Atualmente, conhecem-se centenas de micotoxinas que se encontram já identificadas, todavia, nem todas têm sido igualmente estudadas. Os estudos efetuados privilegiaram, devido à sua maior ocorrência e grau de toxicidade, as aflatoxinas (AFs), as fumonisinas (FBs), as ocratotoxinas (OTs), os tricotecenos (TRC) e a zearalenona (ZEA ou ZON), bem como os seus metabolitos. Os principais fungos que estão na origem da formação destas micotoxinas são o *Aspergillus*, o *Penicillium* e o *Fusarium* (Pereira, Fernandes e Cunha, 2014).

Quando, em algum alimento, nomeadamente num cereal, estão contidas micotoxinas, podem verificar-se episódios de doença agudos ou crónicos. Estes efeitos podem ser carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, estrogénicos, hemorrágicos, nefro e hepatotóxicos, neurotóxicos e/ou imunossupressores. Dependendo do metabolismo, as micotoxinas podem sofrer alterações que se refletem em diferentes formas e diferentes graus de toxicidade. Por outro lado, e não menos importante, há que ter presente que as micotoxinas terão uma influência distinta no ser humano devido às múltiplas suscetibilidades próprias de cada indivíduo (Pereira, Fernandes e Cunha, 2014).

3. Esterigmatocistina

A esterigmatocistina (STC) é um metabolito secundário produzido por mais de cinquenta espécies de fungos, incluindo o *Aspergillus* (*A.*) e os gêneros *Emericella*, *Chaetomium*, *Botryotrichum* e *Humicola* (EFSA, 2013; Hossain e Goto, 2014). De entre todos os fungos, destacam-se o *Aspergillus versicolor*, o *A. flavus*, o *A. parasiticus*, o *A. nidulans* e o *A. rugulosus*, visto serem o produtor primário da STC (Li et al., 2014).

Biossinteticamente, a STC partilha a sua estrutura com as aflatoxinas, uma vez que atua como precursor da aflatoxina BI (AFBI) e com a aflatoxina GI (AFGI), apenas em algumas espécies (Figura 1). Aparentemente, o *A. nidulans* e o *A. versicolor* são, na realidade, incapazes de converter a STC em O-metilesterigmatocistina, precursor direto da AFBI e da AFGI. Por consequência, os substratos colonizados por estes fungos podem conter elevados níveis de STC, enquanto que substratos contaminados com *A. flavus* e *A. parasiticus* contêm baixos níveis de STC, dado que grande parte da micotoxina é convertida em aflatoxinas (Biancardi e Dall'Asta, 2015; EFSA, 2013) (Figura 2).

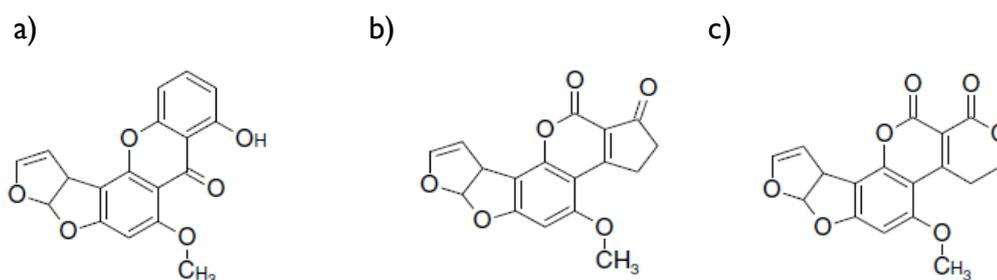


Figura 1 – Estruturas químicas da STC (a), da AFBI (b) e da AFGI (c) (adaptado de Sasaki et al., 2014).
STC: (3aR,12cS)-8-hidroxi-6-metoxi-3^a,12c-dihidro-7H-furo[3',2':4,5]furo[2,3-c]xanteno-7-ona
ABI: 4-metoxi-2,3,6^a,9^a-tetrahidrociclopenta(c)furo[3',2',4,5]furo[2,3h]cromeno-1,11-diona
AGI: 5-metoxi-3,4,7^a,10^a-tetrahidro-1H,12H-furo[3',2':4,5]furo[2,3-H]pirano[3,4-c]cromeno-1,12-diona

3.1. Características físico-químicas

A esterigmatocistina tem uma estrutura muito semelhante à da aflatoxina BI, uma vez que é o seu precursor biossintético (Figuras 1 e 2). Esta micotoxina poliketónica, cuja fórmula química é C₁₈H₁₂O₆, mais concretamente ((3aR,12cS)-8-hidroxi-6-metoxi-3^a,12c-dihidro-7H-furo[3',2':4,5]furo[2,3-c]xanteno-7-ona), faz-se constituir por um grupo xantona e anéis furanos (Li et al., 2014).

Esta micotoxina apresenta o valor de 324.28 g/mol, como massa molecular, cristaliza a um ponto de fusão entre 245-246 °C, sob a forma de “agulhas amarelas” (EFSA, 2013).

A STC é facilmente solúvel em clorofórmio, bem como em outros solventes orgânicos, tais como o metanol, o etanol e o acetonitrilo. Por outro lado, apresenta baixa

solubilidade em soluções aquosas (tampão fosfato) a diferentes valores de pH. Septien *et al.* (1993) observaram uma estabilidade de mais de 95 % do composto em clorofórmio, a 4 °C e a - 20 °C, durante 30 dias (EFSA, 2013).

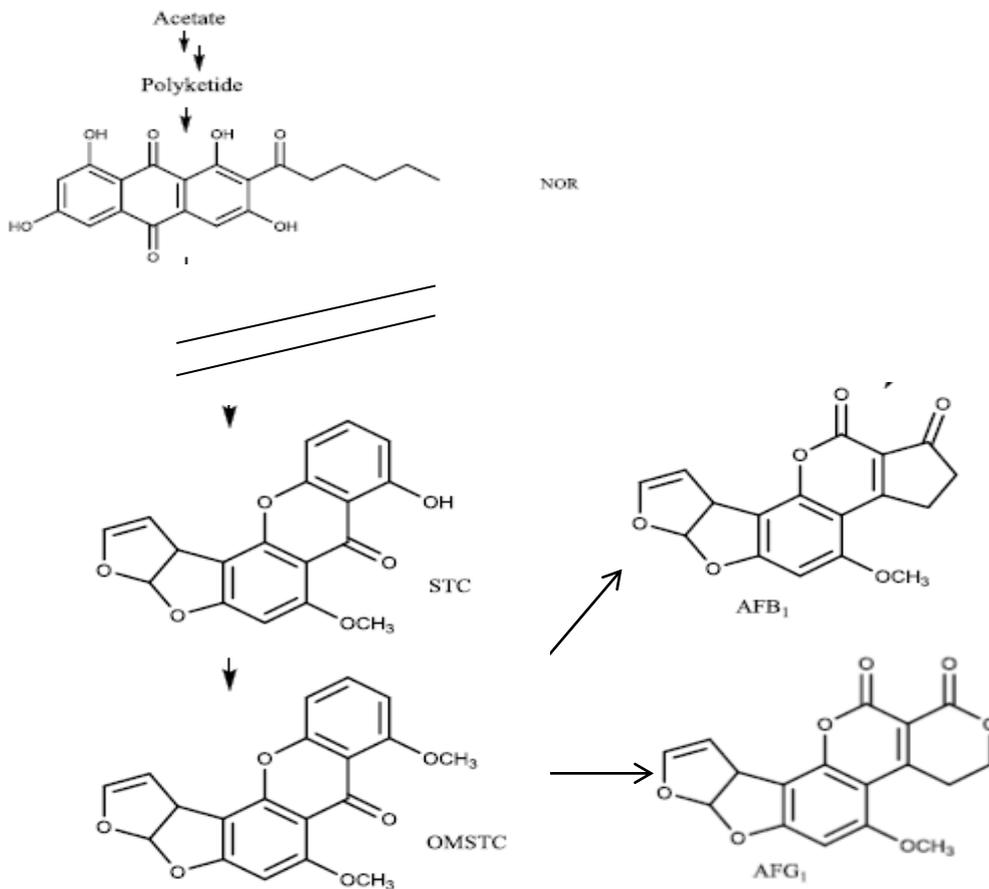


Figura 2 – Biossíntese da STC e da AFB1 (adaptado de EFSA, 2013).
 Abreviaturas: NOR: ácido norsolorínico; STC: esterigmatocistina; OMSTC: O-metilesterigmatocistina

3.2. Toxicocinética

Enquanto que a toxicologia e, conseqüentemente, a toxicocinética das aflatoxinas e de outras micotoxinas está bem estudada e descrita (Pfeiffer, Fleck e Metzler, 2014), da STC muito pouco é conhecido sobre a sua ativação e inativação (Biancardi e Dall’Asta, 2015). Muito recentemente, uma nova visão acerca do metabolismo oxidativo da esterigmatocistina foi reportada por Pfeiffer, Fleck e Metzler (2014) e por Biancardi e Dall’Asta (2015).

Segundo Pfeiffer, Fleck e Metzler (2014), a STC, tal como a aflatoxina B1, é hepatocarcinogénica e forma aductos com o DNA (a presença de uma dupla ligação no primeiro anel furano origina um epóxido) depois de se tornar metabolicamente ativa. A STC, quando incubada com isoformas de P 450 (uma monoxigenada e outra dioxigenada) de humanos, forma os mencionados aductos com o glutatião reduzido (GSH) quando este foi adicionado na incubação. Contudo, a estrutura química desses compostos está sujeita a

confirmação, por subsistirem algumas reservas. Nesse estudo, é reportado que os microsomas hepáticos, predominantemente de humanos e de ratos, formam catecolaminas com a STC, pela via da hidroxilação do anel aromático, preferindo este mecanismo ao da epoxidação do anel de furano. De acordo com o mesmo estudo, a hidroxilação do anel aromático, com a produção da catecolamina, representa a maior e mais recente via do metabolismo de oxidação da STC que contribui para os efeitos tóxicos e genotóxicos desta micotoxina.

Segundo a EFSA (2013), a escassa informação avaliada sugere que a absorção da STC é limitada pela exposição oral. Acerca da sua ativação, acredita-se que forma aductos de DNA que provavelmente são os responsáveis pelo efeitos mutagénicos. A STC induz citotoxicidade, inibe o ciclo celular e a mitose, bem como aumenta a formação de espécies reativas de oxigénio e peroxidação de lípidos *in vivo*. A micotoxina é metabolizada no fígado e no pulmão por vários citocromos P 450, em diferentes hidroximetabolitos e exo-epóxidos que formam prontamente aductos com o DNA. A excreção de ambos os conjugados de STC e os metabolitos hidroxilados ocorre por via biliar e urinária (Böhm, Saeger e Edler, 2013).

Apesar de a STC ser um tóxico potente e apresentar carcinogénese em animais, como ratos, macacos e peixes, por via oral, intraperitoneal, subcutânea ou aplicação dermatológica, a sua influência nos humanos é ainda desconhecida, sabendo-se, por enquanto, que é menos tóxica que as aflatoxinas (Biancardi e Dall'Asta, 2015; EFSA, 2013; Pfeiffer, Fleck e Metzler, 2014). No entanto, observam-se neoplasias, após administração oral, incluindo carcinomas hepatocelulares e adenomas pulmonares (EFSA, 2013; Pfeiffer, Fleck e Metzler, 2014). Ainda assim, a esterigmatocistina foi, em 1987, considerada pela IARC, pertencente ao grupo 2B (possivelmente carcinogénico para o Homem), tendo em conta a evidência de que pode causar cancro nos humanos. Porém, os estudos realizados até ao presente não são conclusivos, pelo que se afigura como necessário um melhor e mais profundo conhecimento dos seus possíveis efeitos (Biancardi e Dall'Asta, 2015; Hossain e Goto, 2014).

Num outro estudo de Uhlig *et al.* (2013), a esterigmatocistina mostrou ser genotóxica *in vitro* quando comparada com a aflatoxina, mas parece ser significativamente menos hepaticarcinogénica que a anterior.

3.3. Incidência

Até ao momento atual, nenhum país promulgou um regulamento oficial para monitorizar os índices de esterigmatocistina nos alimentos. Segundo a FAO, apenas a

República Checa e a Eslováquia, antes da sua entrada na União Europeia, legislaram um nível de 5 µg/kg para alguns alimentos (o arroz, os vegetais, as batatas, a farinha, o tecido muscular das aves domésticas, a carne e o leite) e 20 µg/kg para outros géneros alimentícios (Li *et al.*, 2014; Marley *et al.*, 2015). Em súmula, esses dois países legislaram níveis entre 5 e 20 µg/kg para determinados alimentos (Hossain e Goto, 2014). Sabe-se também que na China só são aceites níveis de STC abaixo de 25 µg/kg (Li *et al.*, 2014).

Tal como já foi referido, poucos são os estudos que se debruçam somente na incidência da esterigmatocistina. Porém, têm sido, ocasionalmente, reportados casos da presença de STC em rações e alimentos, especialmente em cereais como o trigo, o milho, os amendoins, entre outros (Li *et al.*, 2014).

A tabela I que se segue apresenta os dados recolhidos em diferentes artigos científicos que serviram de suporte a este estudo. Nela, constam os países e os cereais e derivados em que foi detetada a presença da STC, bem como a sua incidência.

Da análise destes dados, pode constatar-se que há uma maior frequência (29 %) da STC em Moçambique, em cereais como arroz, sorgo, trigo, painço e soja, seguindo-se a Letónia, com uma frequência de 25,6 % no trigo, na aveia, no centeio e na cevada. Na Noruega, embora se verifiquem valores elevados, cerca de 57 % na aveia, deve ser tido em conta que esses valores foram obtidos sob condições climáticas excepcionais (aumento de, em média, 1,8 °C de temperatura e aumento em 130 % da precipitação). Países como a Grécia, a Itália, a Holanda, o Reino Unido, o Chipre, a Alemanha, a Letónia, a Lituânia e a Polónia apresentam uma incidência muito significativa desta micotoxina na aveia, no arroz e em cereais de pequeno-almoço/muesli, sendo respetivamente de 22 %, 21 % e 19 %. Nestes mesmos países, os dados revelam que a incidência no trigo, no centeio, no milho e na cevada é de 2 % a 6 %, a menor percentagem verificada, com exceção do milho, na África do Sul, onde a incidência é nula. No que concerne aos valores mínimos e máximos, encontram-se compreendidos entre 0,7 e 100 µg/kg. As médias situam-se entre 1,5 e 41,85 µg/kg.

3.4. Metodologias Analíticas

A EFSA, consciente da limitada informação sobre a ocorrência de STC e consequente avaliação do risco resultante da exposição a alimentos contaminados pela mencionada micotoxina, recomenda que sejam feitos mais estudos. Reconhece a necessidade de se investir mais no conhecimento da ocorrência da STC e também na investigação e na procura de métodos analíticos mais sensíveis que permitam analisar amostras de alimentos na UE (Hossain e Goto, 2014; Uhlig *et al.*, 2013).

Tabela I – Frequência (%) e níveis (µg/kg) de STC em cereais e derivados.

País	Cereal	Frequência (%)	Min-Máx (µg/kg)	Média (µg/kg)	Bibliografia
Letónia	Aveia } Centeio } Cevada } Trigo }	25,6	0,7 – 83	41,85	(Sasaki <i>et al.</i> , 2014)
Japão	Milho } Trigo } Arroz }	-	5-100	-	(Hossain e Goto, 2014)
Grécia } Itália } Holanda } Reino Unido } Chipre } Alemanhã } Letónia } Lituânia } Polónia }	Trigo (n=221) } Centeio (n=35) } Milho (n=33) } Cevada (n=59) } Aveia (n=51) } Arroz (n=117) } Cereais de } pequeno } almoço/muesli } (n=97) } Pão (n=143) }	2 – 6 } 22 } 21 } 19 } 7 }	- } - } 1,5 – 6 } 33 (1 amostra) } - } - }	1,5 } 33 } - } - }	(Mol <i>et al.</i> , 2015)
África do Sul	Milho (n=42)	0	-	-	(Hickert <i>et al.</i> , 2015)
Burkina Faso	Milho } Arroz } Sorgo } Trigo } Painço } Soja }	8 } 7 }	2,2 – 2,5 } 4,8 – 8,6 }	2,3 } 6,7 }	(Warth <i>et al.</i> , 2012)
Moçambique	Milho } Arroz } Sorgo } Trigo } Painço } Soja }	8 } 29 }	- } 3,0 – 49,2 }	2,7 } 26,1 }	(Warth <i>et al.</i> , 2012)
Noruega	Cevada } Aveia } Trigo }	15 } 57 } 7 }	- } - } - } 1,2 } 20,1 } 1,0 }	1,0 } 2,1 } 1,0 }	(Uhligh <i>et al.</i> , 2013)

Nota: sempre que um espaço se encontra com um traço, significa que não foram encontrados dados.

Para a extração da STC presente em cereais, o solvente de eleição usado é o acetoneitrilo, isoladamente, em mistura com água ou com água e ácido fórmico ou ácido acético (Tabela 2).

Seguidamente, a purificação é normalmente feita por extração em fase sólida (SPE) com colunas de imunoafinidade (IAC) (Hickert *et al.*, 2015).

Os métodos mais comumente utilizados para a deteção e quantificação de uma micotoxina são as reações imunoquímicas por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

e a separação cromatográfica (LC ou GC) conjuntamente com detecção por ultravioleta (UV), por fluorescência (FLD) ou por espectrometria de massa (MS).

Tabela 2 – Métodos utilizados na detecção e quantificação da STC, em cereais e derivados.

Cereal	Extração	Purificação	Deteção e Quantificação	Bibliografia
Trigo branco	Acetonitrilo (84 % em água) (100 mL), 30 minutos	SPE: Strata X (500 mg)	LC-MS/MS ESI Coluna cromatográfica de fase reversa: Phenomenex Luna C ₁₈ Fase móvel: 0,01 % de ácido fórmico em acetonitrilo e 0,01 % de ácido fórmico em água (regime isocrático)	(Veršilovskis, Bartkevičs e Miķelsone, 2007)
Aveia Centeio Cevada Trigo	Acetonitrilo (84 % em água) (100 mL) para um erlenmeyer de 300 mL	SPE: AFLAKING IAC	LC-MS APCI positive mode Coluna cromatográfica: ODS Fase móvel A: água contendo 0,1 % de ácido fórmico Fase móvel B: acetonitrilo contendo 0,1 % de ácido fórmico	(Sasaki <i>et al.</i> , 2014)
Sementes de girassol Milho Aveia Centeio Arroz Trigo	Filtro Whatman n.º 113 ou centrifugação	SPE: EASI-EXTRACT STERIGMAT OCYSTIN IAC	HPLC UltiMate 3000 (isocraticamente com acetonitrilo: água (60:40)) LC-MS/MS Coluna cromatográfica: Water ACQUITY TQD Fase móvel A e B constituídas por formato de amónio e ácido fórmico a diferentes concentrações.	(Marley <i>et al.</i> , 2015)
Milho Trigo	Acetonitrilo/água (43/56) contendo 0,1 % de ácido fórmico	Filtração com filtro de nylon (0,2 µm)	LC-MS Coluna cromatográfica Fase móvel A: água com 0,1 % de ácido fórmico Fase móvel B: metanol com 0,1 % ácido fórmico	(Ates <i>et al.</i> , 2014)
Milho Trigo Arroz	Acetonitrilo	SPE: AFLAKING IAC	LC-MS GC-MS QP2010 plus system	(Hossain e Goto, 2014)
Milho	Acetonitrilo		HPLC-MS/MS AB SCIEX Coluna cromatográfica: Eksigent™ MicroLC 200 System Fase móvel A: acetonitrilo e 0,1 % de ácido fórmico Fase móvel B: água e 0,1 % de ácido fórmico	(Hickert <i>et al.</i> , 2015)
Cevada Aveia Trigo	Centrifugação com acetonitrilo/água/ácido acético 79:20:1 (v/v/v)		LC-MS/MS com turbo ESI Coluna cromatográfica: QTRAP 5500 Fase móvel A: metanol/água/ácido acético 10:89:1 (v/v/v) contendo 5mM de acetato de amónio Fase móvel B: metanol/água/ácido acético 97:2:1 (v/v/v) contendo acetato de amónio	(Uhlig <i>et al.</i> , 2013)

Uma nova geração de espectrometria de massa proporciona maior sensibilidade, permitindo utilizar menor preparação de amostra e fazer deteções de multi-micotoxinas (Hickert *et al.*, 2015).

3.5. Reflexão da Análise / Interpretação dos Resultados

Após a apresentação dos dados, importa agora fazer uma reflexão sobre as conclusões que estes permitem tirar, aquilo que podem representar ou as questões que levantam.

Quanto à primeira tabela, parece poder afirmar-se que a maior incidência ou ausência de STC não depende do tipo de cereal, pois verifica-se que, por exemplo, em relação ao milho, são apresentados valores diferentes, em diferentes países (África do Sul, 0 %, e Moçambique, 8 %). Por outro lado, também é curioso verificar que, em países diferentes como sejam Moçambique e Burkina Faso, o valor de incidência seja o mesmo para o milho. Porém, em cereais como o arroz, o sorgo, o trigo, o painço e a soja, nestes dois países, os valores de incidência são praticamente os extremos, dado que em Moçambique atingem o máximo, 29 %, e em Burkina Faso, apenas 7 %.

Atendendo ao primeiro país que consta da tabela, até porque é um dos países mais citados nos artigos científicos analisados, há um facto que chama a atenção: existe, efetivamente, nas amostras recolhidas, uma discrepância muito significativa entre os valores mínimo e máximo, 0.7 e 83 µg/kg.

É, pois, com base nesta revisão bibliográfica, que surgem várias questões. Convém referir que muitas delas são também motivadas pela escassez de documentos que reflitam resultados de estudos feitos:

. Como poderá justificar-se que num mesmo país haja taxas de incidência tão díspares em diferentes cereais?

. Uma vez que os fungos que estão na origem da micotoxina proliferam facilmente, terão sido condições ambientais, climáticas ou outras a influenciar o seu aparecimento e desenvolvimento?

. A maior ou menor incidência da STC estará diretamente relacionada com o fungo que lhe deu origem?

. Será que, neste caso, como noutros problemas de saúde, os países mais pobres estão mais vulneráveis à proliferação desta micotoxina?

. Então, como justificar que em vários países da UE, a incidência desta toxina seja tão significativa em cereais de pequeno-almoço e no arroz e na aveia?

. Não será mais correto pensar-se que estes dados possam refletir a ausência de um tipo de controlo comum e apertado das regras de segurança a observar em todas as fases do processo, nos diferentes países?

. E tantas outras dúvidas...

Este conjunto de questões reflete bem a falta de estudos que demonstrem qual ou quais as fases do processo de contaminação mais sensíveis e quais são os agentes potencialmente propiciadores da contaminação. O levantamento e o controlo das diferentes variáveis que possam interferir nos processos, nas diferentes etapas, constituiria um estudo deveras aliciante.

Os dados constantes da segunda tabela parecem, efetivamente, demonstrar que são pouco variados os métodos para a deteção da STC. Embora comece a surgir a procura por novas técnicas e métodos de análise de vários produtos, ainda não existe um método específico para a esterigmatocistina. Poder-se-á, pois, concluir, com base nestes dados e nos artigos analisados e referidos, que não foi ainda feito o investimento necessário, quer na deteção da presença desta micotoxina, quer na procura de técnicas e métodos que a efetivem. Daí que seja feita a recomendação, que não é possível deixar de reiterar, para que sejam realizados estudos que conduzam à descoberta e ao aperfeiçoamento de mecanismos que permitam resultados mais rápidos, mais eficazes e mais conclusivos, para que a ação seja mais atempada, mais assertiva e profilática, evitando-se a contaminação e, por conseguinte, as doenças que, a longo prazo, poderão surgir, devido às micotoxinas.

4. Conclusão

E eis que, pelo menos por agora, dou por concluído este meu estudo.

O repto que me foi lançado constituiu-se, para mim, como um verdadeiro desafio, pois, na verdade, esta micotoxina era-me completamente desconhecida.

Num primeiro momento, confesso que tive algum receio, até porque os documentos fidedignos eram muito escassos. Porém, à medida que me fui embrenhando na problemática e me fui apropriando dos artigos que serviram de suporte ao estudo, verifiquei que este trabalho era necessário, não só porque facultava uma revisão bibliográfica daquilo que se conhece, o que por si só já é muito positivo, mas também porque permite, em contexto científico, falar da existência desta micotoxina e abrir um espaço de reflexão sobre a importância de melhor a conhecer, para, de forma mais eficaz, se fazer o seu controlo e, se possível, a desejável erradicação.

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem observar que, infelizmente, há poucos estudos realizados e dados a conhecer à comunidade científica, acerca da micotoxina em apreço. Contudo, a partir destes, pode afirmar-se que a STC é um tóxico potente, que apresenta carcinogénese em animais. A influência da STC no ser humano é ainda bastante desconhecida, sabendo-se, no entanto, que é menos tóxica que as aflatoxinas. Todavia, não se pode descurar o facto de, ainda assim, a esterigmatocistina ter sido considerada, pela IARC, como pertencente ao grupo 2B, devido à evidência de que é um possível carcinogénico para o ser humano. Porém, os estudos realizados e de que há conhecimento não chegaram a resultados conclusivos.

Outra conclusão que me parece poder emanar deste estudo é a dificuldade que existe na deteção da micotoxina, tendo por base os métodos de análise utilizados. Afigura-se como premente, não apenas o conhecimento da incidência da micotoxina, mas o aperfeiçoamento de métodos e de técnicas mais sensíveis que favoreçam o seu perfeito conhecimento, de modo a possibilitar resultados conclusivos. Só a partir destes, se poderá atuar convenientemente.

Um facto que ressalta do estudo e ao qual não posso deixar de fazer referência, pela preocupação que me suscita, é que os estudos realizados refletem, certamente, uma pequena parte daquilo que pode ser a realidade. Considera-se que a amostra de países onde foram efetuados os estudos é demasiado pequena para que permita fazer extrapolações e generalizações. Assim, os resultados deste estudo não devem e não podem ser extrapolados do contexto em que foram obtidos.

Tendo um maior conhecimento acerca das micotoxinas em geral, e desta em particular, são muitas as questões que se levantam e grande a vontade de conhecer mais acerca de uma problemática tão mais vasta e complexa. Contudo, e perante o conhecimento existente, afigura-se, por agora, pertinente dar a conhecer estas reflexões, quanto mais não seja para que se procurem e se encontrem novos caminhos, novas metodologias, enfim, novas formas de atuar que conduzam a melhores resultados.

Fica a convicção de que estudos mais profundos acerca desta problemática serão bastante profícuos, para a comunidade científica e para a vida no Planeta, pois o que é certo é que todos teremos, com toda a certeza, muito a ganhar com isso.

Bibliografia

ACTOR, J. K. - **Immunology and Microbiology**. Elsevier. 2ª Edição. Mycology. 15, 139-146.

ATES, E.; GODULA, M.; STROKA, J.; SENYUVA, H. - **Screening of plant and fungal metabolites in wheat, maize and animal feed using automated on-line clean-up coupled to high resolution mass spectrometry**. Food Chemistry. 142 (2014), 276-284.

BIANCARDI, A.; DALL'ASTA, C. - **Determination of sterigmatocystin in feed by LC-MS/MS**. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. 32:12 (2015) 2093-100.

EFSA JOURNAL, European Food Safety Authority Journal. - **Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed**. 11:(6) (2013) 1-81.

GOERING, R. V.; DOCKRREL, H. M.; ZUCKERMAN, M.; ROITT, I. M.; CHIODINI, P. L.. - **Mims' Medical Mycology**. 5ª Edição. Elsevier. 4, 37-39.

HASCHEK, W. M.; VOSS, K. A. - **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**, 3ª Edição. 39 1187-1258.

HICKERT, S.; GERDING, J.; NCUBE, E.; HÜBNER, F.; FLETT, B.; CRAMER, B. *et al.* - **A new approach using micro HPLC-MS/MS for multi-mycotoxin analysis in maize samples**. Mycotoxin Research. 31:2 (2015) 109-115.

HOSSAIN, Md Z.; GOTO, T. - **Determination of sterigmatocystin in grain using gas chromatography-mass spectrometry with an on-column injector**. Mycotoxin Research. 31:1 (2014) 17-22.

LI, M.; LI, P.; WU, H.; ZHANG, Q.; MA, F.; ZHANG, Z. *et al.* - **An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for sterigmatocystin in cereal and oil products**. PLoS ONE. 9:9 (2014).

MARLEY, E.; BROWN, P.; MACKIE, J.; DONNELLY, C.; WILCOX, J.; PIETRI, A. & MACDONALD, S. - **Analysis of sterigmatocystin in cereals, animal feed, seeds, beer and cheese by immunoaffinity column clean-up and HPLC and LC-MS/MS quantification**. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. 0049: november (2015) 1-7.

- MOL, H. G. J.; PIETRI, A.; MACDONALD, S. J.; ANAGNOSTOPOULOS, C.; SPANJER, M. - **Survey on sterigmatocystin in food.** RIKILT - Wageningen UR. 1. (2015) 1-56.
- PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. - **Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis.** Trends in Food Science and Technology. 36:2 (2014) 96-136.
- PFEIFFER, E.; FLECK, S. C.; METZLER, M. - **Catechol formation: A novel pathway in the metabolism of sterigmatocystin and 11-methoxysterigmatocystin.** Chemical Research in Toxicology. 27:12 (2014) 2093-2099.
- SASAKI, R.; HOSSAIN, M. Z.; ABE, N.; UCHIGASHIMA, M.; GOTO, T. - **Development of an analytical method for the determination of sterigmatocystin in grains using LCMS after immunoaffinity column purification.** Mycotoxin Research. 30:2 (2014) 123-129.
- SHARMA, R.; SUMBALI, G. - **Natural Occurrence of Aspergilli and Penicilli and Co-Contamination of Aflatoxins and Sterigmatocystin in Some Market Samples of Walnut Kernels From J & K (India).** American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences. ISSN (Print): 2328-3777, 14-319. (2014) 28-36.
- UHLIG, S.; ERIKSEN, G. S.; HOFGAARD, I. S.; KRŠKA, R.; BELTRÁN, E.; SÜLYÖK, M. - **Faces of a changing climate: Semi-quantitative multi-mycotoxin analysis of grain grown in exceptional climatic conditions in Norway.** Toxins. 5:10 (2013) 1682-1697.
- VERŠILOVSKIS, A.; BARTKEVIČS, V.; MIKELSONE, V. - **Analytical method for the determination of sterigmatocystin in grains using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray positive ionization.** Journal of Chromatography A. 1157:1-2 (2007) 467-471.
- WARTH, B.; PARICH, A.; ATEHNKENG, J.; BANDYOPADHYAY, R.; SCHUHMACHER, R.; SÜLYÖK, M. *et al.* - **Quantitation of mycotoxins in food and feed from burkina faso and mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60:36 (2012) 9352-9363.
- ZHENG, R.; XU, H.; WANG, W.; ZHAN, R.; CHEN, W.. - **Simultaneous determination of aflatoxin B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, and sterigmatocystin in traditional Chinese medicines by LC-MS-MS.** Analytical and Bioanalytical Chemistry. 406:13 (2014) 3031-3039.