

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE -  
MEDICINA VETERINÁRIA: MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA  
ÊNFASE EM ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS E PATOLOGIA  
AVIÁRIA

Ana Beatriz Benevides de Freitas

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM AMOSTRAS DE FRUTAS  
SECAS NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2017 A SETEMBRO DE  
2018**

Santa Maria, RS  
2019

**Ana Beatriz Benevides de Freitas**

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM AMOSTRAS DE FRUTAS SECAS NO  
PERÍODO DE OUTUBRO DE 2017 A SETEMBRO DE 2018**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária: Medicina Veterinária Preventiva, Ênfase em Análises Micotoxicológicas e Patologia Aviária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Especialista em Medicina Veterinária Preventiva, com Ênfase em Análises Micotoxicológicas e Patologia Aviária.**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Dilkin

Santa Maria, RS  
2019

**Ana Beatriz Benevides de Freitas**

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM AMOSTRAS DE FRUTAS SECAS NO  
PERÍODO DE OUTUBRO DE 2017 A SETEMBRO DE 2018**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária: Medicina Veterinária Preventiva, Ênfase em Análises Micotoxicológicas e Patologia Aviária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Especialista em Medicina Veterinária Preventiva, com Ênfase em Análises Micotoxicológicas e Patologia Aviária.**

**Aprovado em 8 de março de 2019:**

---

**Paulo Dilkin, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Maristela Lovato, Dra. (UFSM)**  
(Co-orientadora)

---

**Camila Tonini, Me. (UFSM)**

---

**Fernanda Conegatto Paim, Esp. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo seu amor e cuidado comigo durante esta etapa da minha vida profissional.

Ao meu marido, Gustavo, pelo apoio e incentivo na busca de conhecimento profissional e por me ajudar a dar valor às demais áreas de minha vida.

Aos meus pais, Carlos e Ana, e aos meus irmãos, Ana Paula e Filipe, que mesmo longe, me dão apoio emocional.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Dilkin, pelos ensinamentos na caminhada profissional e na realização deste trabalho de conclusão de residência.

À minha co-orientadora, Dr<sup>a</sup>. Maristela Lovato, grande incentivadora para a realização desta residência.

Ao professor Dr. Carlos Mallmann pelos ensinamentos durante a residência no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC).

Aos funcionários, colegas de pós-graduação e estagiários do LAMIC, em especial minha “R2” Fernanda Paim, pelos ensinamentos sobre micotoxinas e sobre a vida e pelo apoio que tive durante este tempo.

Às amigas e colegas residentes, Magda, Ananda e Marília, que caminharam comigo nos primeiros meses de residência.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pós-graduandos e estagiários dos laboratórios de Virologia, Bacteriologia, Doenças Parasitárias e Patologia Aviária, pelos ensinamentos repassados durante o “rodízio”.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária, pela oportunidade e estrutura oferecidas para a realização da residência.

## RESUMO

### OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM AMOSTRAS DE FRUTAS SECAS NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2017 A SETEMBRO DE 2018

AUTORA: Ana Beatriz Benevides de Freitas

ORIENTADOR: Paulo Dilkin

CO-ORIENTADORA: Maristela Lovato

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos. As mais comumente detectadas em frutas são aflatoxinas, ocratoxina A, patulina e toxinas de *Alternaria*. São tóxicas para seres humanos e animais, com efeitos carcinogênicos. A aflatoxina é o carcinógeno natural mais potente existente, sendo classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como carcinogênicas para humanos (grupo 1). A manifestação clínica aguda da intoxicação por aflatoxinas em humanos é uma hepatite aguda e aflatoxicose crônica em humanos está associada com carcinoma hepatocelular. O presente trabalho analisou a ocorrência de aflatoxinas em amostras de frutas secas importadas pelo Brasil no período de outubro de 2017 a setembro de 2018 utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção de fluorescência. O limite de quantificação foi de 1 µg/kg. Foram analisadas 376 amostras de frutas secas, sendo 249 de uva passa, 96 de ameixa, 28 de damasco, e 3 de figo. Nenhuma amostra apresentou níveis detectáveis de aflatoxinas, demonstrando que as frutas secas importadas são alimentos seguros quanto a presença de aflatoxinas.

Palavras-chave: Aflatoxinas. Frutas Secas. Micotoxinas.

## ABSTRACT

### OCCURRENCE OF AFLATOXINS IN SAMPLES OF DRIED FRUITS FROM OCTOBER 2017 TO SEPTEMBER 2018

AUTHOR: Ana Beatriz Benevides de Freitas

ADVISOR: Paulo Dilkin

CO-ADVISOR: Maristela Lovato

Mycotoxins are secondary metabolites of fungi. The most commonly detected in fruits are aflatoxins, ochratoxin A, patulin and *Alternaria* toxins. They are toxic to humans and animals, with carcinogenic effects. Aflatoxin is the most potent naturally occurring carcinogen and is classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as carcinogenic to humans (group 1). The acute clinical manifestation of aflatoxin intoxication in humans is acute hepatitis and chronic aflatoxicosis in humans is associated with hepatocellular carcinoma. The present work analyzed the occurrence of aflatoxins in dried fruit samples imported by Brazil from October 2017 to September 2018 using high performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection. The limit of quantification was 1 µg/kg. A total of 376 dried fruit samples were analyzed, 249 of which were raisins, 96 of plum, 28 of apricots, and 3 of figs. No sample had detectable levels of aflatoxins, demonstrating that imported dried fruits are safe foods for the presence of aflatoxins.

Keywords: Aflatoxins. Dried fruits. Mycotoxins.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química das aflatoxinas.....	12
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Aflatoxina
Aw	Atividade de água
CCD	Cromatografia em camada delgada
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FLD	Fluorescência
GC	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-FLD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção de fluorescência
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LC	Cromatografia líquida
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
PNCRC/Vegetal	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal
UE	União Europeia
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>10</b>
2.1 FRUTAS SECAS .....	10
2.2 AFLATOXINAS .....	11
2.3 AFLATOXINAS EM FRUTAS SECAS .....	13
2.4 EFEITOS DAS AFLATOXINAS SOBRE HUMANOS E ANIMAIS.....	15
2.5 LEGISLAÇÃO SOBRE LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS PARA AFLATOXINAS EM ALIMENTOS NO BRASIL.....	17
2.6 ANÁLISE DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS.....	18
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 LOCAL DO ESTUDO .....	20
3.2 RECEBIMENTO DE AMOSTRAS.....	20
3.3 PREPARO DA AMOSTRA E EXTRAÇÃO DA AFLATOXINA .....	20
3.4 DILUIÇÃO DE AMOSTRAS .....	21
3.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	21
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>24</b>
<b>ARTIGO .....</b>	<b>28</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos que ocorrem em grãos e alimentos. São tóxicas para seres humanos e animais. Aproximadamente 400 metabólitos secundários com potencial toxigênico produzido por mais de 100 fungos já foram identificados, sendo as aflatoxinas, os tricotecenos, as fumonisinas, a zearalenona, a ocratoxina A, os alcalóides do ergot e a patulina os mais importantes (BENNET, KLICH, 2003; KABAK, DOBSON, VAR, 2006).

Os fungos toxigênicos podem produzir as micotoxinas no campo, durante o crescimento da planta, durante a colheita, secagem ou armazenamento, dependendo da umidade e temperatura (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

O crescimento de fungos nos alimentos não está necessariamente associado à formação de micotoxinas. Tem sido demonstrado que condições de estresse ambiental, como infestação de insetos, seca, suscetibilidade de cultivares, danos mecânicos, deficiências nutricionais, temperatura, chuva ou umidade fora dos padrões normais da estação, favorecem a produção de micotoxinas pelos fungos. As micotoxinas são estáveis durante o armazenamento e o processamento, mesmo quando os alimentos são cozidos em temperaturas elevadas, sendo encontradas ainda que os fungos não estejam mais presentes (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010; KABAK, 2009).

Medidas preventivas destinadas à inibição da formação de micotoxinas em produtos agrícolas são a abordagem mais eficaz para evitar a exposição do consumidor, são elas: o bom manejo agrícola, os métodos de cultura para melhorar o vigor das plantas, o uso de inseticidas, fungicidas e controle biológico, a irrigação e a seleção de cultivares que garantem que as plantas sejam menos vulneráveis ao estresse. A contaminação pós-colheita pode ser evitada pelo controle da umidade, temperatura e pragas. A detoxificação de micotoxinas nos alimentos é menos eficaz e restrita devido a possíveis perdas na qualidade nutricional e ao custo; envolvem o uso de microorganismos ou adsorventes para reduzir a absorção de micotoxinas no trato gastrointestinal. (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010; KABAK, DOBSON, 2009).

Para evitar os danos causados pelas micotoxinas à saúde humana e animal, certos países estabeleceram legislações com limites máximos tolerados nos alimentos e rações. Além dos danos à saúde, a contaminação por micotoxinas

também resulta em perdas diretas de produtos agrícolas, custos indiretos dos sistemas de controle existentes para algumas micotoxinas, custos de detoxicação para recuperar um produto aceitável e rejeição de produtos pelo mercado importador, causando perdas econômicas para os países exportadores (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010; IAMANAKA, OLIVEIRA, TANIWAKI, 2010).

O objetivo deste trabalho foi identificar a ocorrência de aflatoxinas em amostras de frutas secas importadas no período de outubro de 2017 a setembro de 2018 utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção de fluorescência.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 FRUTAS SECAS**

Frutas e vegetais são fontes importantes de nutrientes essenciais da dieta, como vitaminas, minerais e fibras. O teor de umidade de frutas e vegetais frescos é de mais de 80%, sendo classificadas como alimentos altamente perecíveis (SAGAR, SURESH, 2010). Dessa forma, para sua distribuição é necessário que haja baixas temperaturas em toda a cadeia de distribuição. A secagem é uma alternativa para o manejo pós-colheita, pois mantém o valor nutricional, aumenta a vida de prateleira e promove a segurança dos alimentos. Além disso, diminui exigências de embalagem, custo de transporte em relação a peso e volume e aumenta o valor do produto colhido. O desafio da secagem de frutas e vegetais é reduzir o teor de umidade a um nível no qual o crescimento microbiano não ocorra e seja mantido o alto valor nutricional (ORSAT, CHANGRUE, RAGHAVAN, 2006).

Frutas com alto teor de açúcar e ácido são adequadas para secar sob o sol. A secagem ao sol limita-se a climas quentes e uma atmosfera seca e a certas frutas, como passas, ameixas, figos, damascos, peras e pêssegos. Por causa das condições climáticas adequadas, a secagem ao sol é um dos métodos mais comuns de preservação de alimentos nos países mediterrâneos. Durante a secagem pode ocorrer a deterioração dos frutos e a formação de micotoxinas (OZER, BASEGMEZ, OZAY, 2012).

A baixa qualidade e a contaminação dos produtos pela secagem ao sol levaram ao desenvolvimento de tecnologias alternativas de secagem. Os métodos de secagem incluem secagem por convecção, natural ou artificial; desidratação

osmótica; vácuo; alta pressão hidrostática; campo elétrico pulsado; ultrassom; micro-ondas; vapor superaquecido; liofilização; pulverização (spray drying) e associações desses métodos (SAGAR, SURESH, 2010).

A escolha do método de secagem depende de vários fatores, como o tipo de produto, a disponibilidade do secador, o custo da desidratação e a qualidade final do produto dessecado. O consumo de energia e a qualidade dos produtos secos são outros parâmetros críticos na seleção de um processo de secagem (SAGAR, SURESH, 2010).

As frutas contêm ácidos naturais (ácidos cítrico, málico e tartárico) que dão aos frutos acidez e retardam a deterioração bacteriana. O pH dos frutos varia entre 2,5 e 5,0, valores toleráveis para muitas espécies de fungos. As micotoxinas mais comumente encontradas em frutas e seus produtos processados são aflatoxinas, ocratoxina A, patulina e toxinas de *Alternaria* (DRUSCH, RAGAB, 2003; FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010).

A presença de bolores em frutas secas representa alto risco à saúde, porque estes alimentos são consumidos sem nenhuma etapa específica de detoxificação. As tecnologias de tratamento pós-colheita (além da secagem) disponíveis para estender o prazo de validade de frutas secas são bastante limitadas. Algumas destas tecnologias são: radiação ionizante com cobalto-60, raios X ou feixe de elétrons (e-beam), controlando os patógenos veiculados por alimentos, dentre eles os fungos, e estendendo a vida de prateleira destes produtos (IC et al., 2007; SMITH, PILLAI, 2004).

Muitos estudos estabeleceram a eficácia da ozonização como um processo de descontaminação de toxinas em alimentos. Taxas significativas de degradação (até 95%) foram relatadas por aplicações de ozônio em figos secos (ZORLUGENC et al., 2008). No entanto, os produtos de degradação da reação entre o ozônio e a toxina devem ser identificados para avaliar a aceitabilidade e aplicabilidade do processo de ozonização como método de descontaminação (KARACA, VELIOGLU, NAS, 2010).

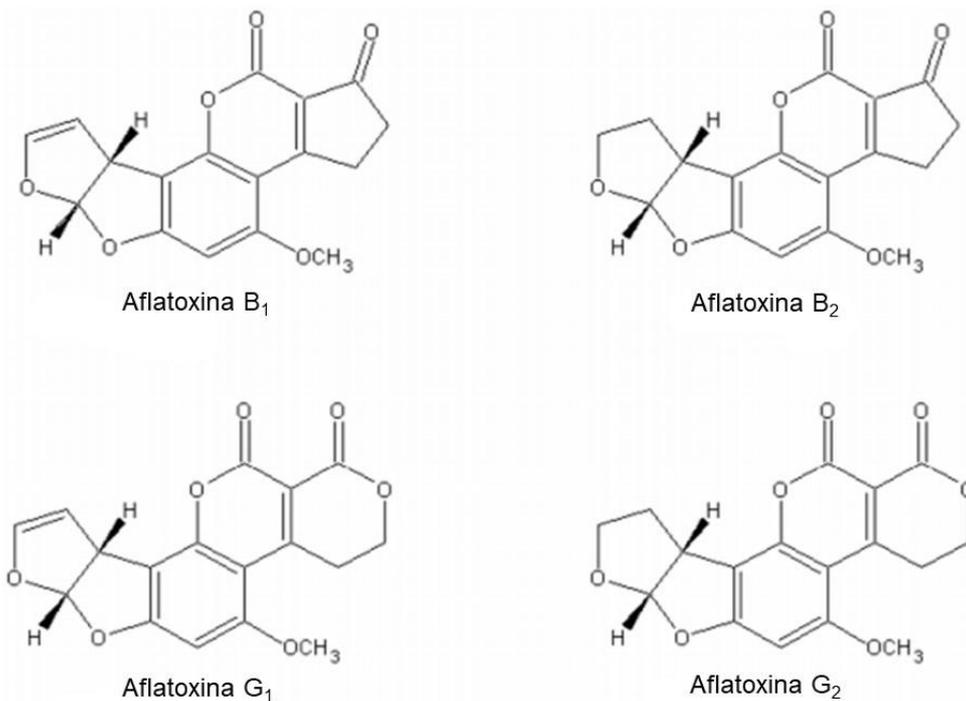
## 2.2 AFLATOXINAS

As aflatoxinas são um grupo de micotoxinas estruturalmente semelhantes que contaminam culturas de extrema importância econômica, como o milho, amendoim,

feijão, arroz, trigo, algodão, sorgo, e também frutas (CORRÊA, 2000). São classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como carcinogênicas para humanos (grupo 1) (IARC, 2012).

Quatro aflatoxinas possuem importância toxicológica reconhecida: aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) (HUSSEIN; BRASEL, 2001). A AFB<sub>1</sub> é a de maior poder toxigênico, seguida da G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub>, respectivamente (FACCA; DALZOTO, 2010). São compostos heterocíclicos, possuem um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanoide (Figura 1) e distinguem-se cromatograficamente por sua fluorescência sob luz ultravioleta. A aflatoxina B<sub>1</sub> e aflatoxina B<sub>2</sub> têm fluorescência azul (B de “blue”) e aflatoxina G<sub>1</sub> e aflatoxina G<sub>2</sub> têm fluorescência verde amarelada (G de “green”) (SILVA, 2005).

Figura 1 – Estrutura química das aflatoxinas



Fonte: REITER et al., 2009.

São produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, sobretudo por *A. flavus* e *A. parasiticus* (KAWASHIMA, 2004). Altas temperaturas (27 – 38 °C), atividade de água (Aw) de 0,99 e alta umidade relativa (85%) favorecem o crescimento de *Aspergillus* no campo (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010). Evidências sugerem que a produção

de micotoxinas conferem uma vantagem competitiva ao fungo produtor, que as produz em maior quantidade sob condições de estresse (MAGAN, ALDRED, 2007).

Schmidt-Heydt et al. (2010) estudaram a influência da combinação da atividade de água ( $A_w$ ), temperatura e a biossíntese de aflatoxinas pelo *Aspergillus parasiticus*. As condições externas tiveram um efeito diferencial na biossíntese da aflatoxina B<sub>1</sub> ou G<sub>1</sub>. *A. parasiticus* produziu grandes quantidades de aflatoxina B<sub>1</sub> em temperaturas superiores a 30 °C, com uma produção ótima a 37 °C. Em temperaturas entre 30 e 37 °C, a biossíntese de aflatoxina B<sub>1</sub> foi independente da  $A_w$ , desde que estivesse acima de 0,90. Em temperaturas mais baixas (20 a 25 °C), a aflatoxina B<sub>1</sub> foi formada em maiores quantidades em níveis mais altos de  $A_w$  (0,98 a 0,99). Em temperaturas acima de 37 °C, a biossíntese da aflatoxina B<sub>1</sub> diminuiu acentuadamente. Em contraste, a produção ótima de aflatoxina G<sub>1</sub> é dependente da  $A_w$ . Grandes quantidades de aflatoxina G<sub>1</sub> foram produzidas em  $A_w$  de 0,98 e 0,99, em temperaturas entre 20 e 30 °C. Em temperaturas acima de 30 °C e abaixo de 17 °C, a produção de aflatoxina G<sub>1</sub> cai drasticamente.

### 2.3 AFLATOXINAS EM FRUTAS SECAS

Estudos sobre aflatoxinas em frutas são limitados a frutos de regiões com temperaturas relativamente altas. Há maior ocorrência de aflatoxina em figos secos e uvas passas. A aflatoxina B<sub>1</sub> também foi encontrada em damascos secos, ameixas e tâmaras (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010; TRUCKSESS, SCOTT, 2008).

Iamanaka et al. (2005) analisaram amostras de frutas secas (uvas passas, damasco, ameixas, tâmaras e figos) vendidos no Brasil, oriundos de todo o mundo (Argentina, Chile, Irã, Turquia, Espanha, Estados Unidos e México) e encontraram fungos relacionados à produção de micotoxinas do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. flavus*. *A. flavus* foi isolado em uvas passas brancas e figos secos. Outras espécies como *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium* e leveduras também foram isoladas.

A correlação entre a presença de fungos toxigênicos e produção de micotoxina nem sempre é evidente. Isso pode ser explicado pelo processo de secagem usado. Se os frutos foram secos por processo natural (secagem ao sol) e não houve tratamento térmico, os fungos toxigênicos podem estar presentes na amostra. Por outro lado, se os frutos foram secos por tratamento térmico ou ar

forçado, as temperaturas normalmente usadas de 50 a 70 °C matam a maioria dos fungos toxigênicos, não havendo a correlação entre a presença de fungos e a contaminação por micotoxina (IAMANAKA et al., 2005). Dessa forma, se torna importante a detecção da micotoxina e não do fungo, para o consumo humano ou animal.

O Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) no Rio Grande do Sul, avaliou 70 amostras de frutas secas (uvas passas, damascos, ameixas secas e peras secas) comercializadas no Brasil no ano de 2002. Das amostras analisadas, 7,1% apresentaram contaminação por aflatoxinas. Uma amostra de ameixa seca apresentou 102 µg/kg de aflatoxinas, sendo esse valor superior ao limite máximo permitido pela legislação (MALLMANN et al., 2003).

Iamanaka et al. (2007) avaliaram a presença de aflatoxinas e fungos produtores de aflatoxinas em 62 amostras de frutas secas comercializadas em São Paulo entre 2002 e 2003, importadas da Argentina, Chile, Irã e Turquia. Foram analisadas 24 amostras de uvas passas pretas, 19 de uvas passas brancas e 19 de figos secos. Isolou-se apenas o fungo *A. flavus*, em 1 amostra de uva passa branca e 1 de figo seco. Foram detectadas aflatoxinas em 16% das amostras de uvas passas brancas, com contaminação máxima de 2 µg/kg. Das amostras de figo seco, 58% apresentaram aflatoxinas, sendo uma amostra com contaminação de 1500 µg/kg de aflatoxina B<sub>1</sub> e as demais variaram de 0,3 a 2 µg/kg. Quanto às uvas passas pretas, nenhuma amostra apresentou aflatoxina. Este produto não parece ser um substrato satisfatório para o crescimento de *A. flavus* e produção de aflatoxina.

As uvas passas pretas são um substrato mais adequado para *A. niger* e *A. carbonarius*, que produzem ocratoxina A (ABARCA et al., 2003; IAMANAKA et al., 2005). O mesmo ocorre com ameixas secas (OZER, BASEGMEZ, OZAY, 2012).

Os damascos parecem ser bons substratos para desenvolvimento de aflatoxinas. Günsen e Buyukyoruk (2002) analisaram AFB<sub>1</sub> em 15 amostras de damasco seco e três delas estavam contaminadas com níveis médios de 1,44 ng/kg. A baixa incidência de fungos e a contaminação por micotoxinas em damasco podem ser devidas ao tratamento com dióxido de enxofre (KARACA, VELIOGLU, NAS, 2010).

Os figos diferem de outras frutas, pois os fungos toxigênicos podem crescer e produzir aflatoxinas na superfície externa ou no interior da cavidade, mesmo que não ocorram danos na pele, e sua composição alta de açúcar favorece o desenvolvimento fúngico. Alguns insetos podem atuar como vetores na transferência dos fungos aflatoxigênicos para a cavidade do fruto. O período crítico para a formação de aflatoxinas em figos secos começa com o amadurecimento dos figos na árvore, continua durante o período de maturação quando eles perdem água e caem no chão e até secarem completamente em bandejas de secagem (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2008). Kabak (2016) detectou aflatoxinas em 12,3% das amostras de figo seco em níveis variando entre 0,1 e 28,2 µg/kg. Todas as 4 aflatoxinas foram detectadas, mais frequentemente AFB<sub>1</sub> (12,3%), com níveis variando de 0,1 a 12,5 µg/kg. Nouara et al. (2018) analisou 33 figos secos coletados de produtores locais na Argélia entre 2015 e 2017 e 26 amostras se mostraram positivas para aflatoxinas, variando de 0,22 a 83,4 µg/kg.

#### 2.4 EFEITOS DAS AFLATOXINAS SOBRE HUMANOS E ANIMAIS

A ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas pode produzir efeitos agudos e crônicos em humanos e animais. Outras formas de exposição, como a exposição dérmica, resulta em absorção lenta e insignificante, e a exposição por inalação em humanos não foi bem estudada devido à falta de relevância na toxicologia alimentar (FUNG, CLARK, 2004).

Diversos efeitos atribuídos às aflatoxinas foram observados em estudos experimentais com animais submetidos a dietas e/ou exposição a estes metabólitos. Estes efeitos variaram de acordo com a idade, raça, estado nutricional, espécie, tempo de exposição e dose administrada. A exposição às aflatoxinas pode causar problemas imunológicos, distúrbios hematopoiéticos como síndromes de hemorragia anêmica e danos significativos ao fígado (efeitos hepatotóxicos). Experimentalmente foram demonstrados, também, efeitos teratogênicos causados pela aflatoxina B<sub>1</sub> (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

Após a absorção, 65% da AFB<sub>1</sub> é eliminada do sangue em 90 minutos e a meia-vida plasmática é curta. A meia-vida das aflatoxinas testadas em homogenatos de fígado humano é de aproximadamente 13 minutos. Estudos de metabolismo *in vitro* mostraram as seguintes reações metabólicas para AFB<sub>1</sub>: a redução produz

aflatoxicol; a hidroxilação produz AFM<sub>1</sub>; a hidratação produz AFB<sub>2a</sub>; e a epoxidação produz AFB<sub>1</sub>-2,3-epóxido. O epóxido é o metabólito mais reativo e acredita-se que seja responsável pela toxicidade aguda e crônica da AFB. O epóxido de AFB<sub>1</sub> ocorre nas formas endo e exo. O exo-epóxido é altamente eletrofílico e reage com a porção guanina do DNA para formar ligações covalentes no resíduo guanina N-7, levando à depurinação e à carcinogênese. Depurinação é um processo em que a base purina de uma molécula de DNA é perdida, levando potencialmente a uma mutação somática e carcinogênese (FUNG, CLARK, 2004).

O mecanismo de toxicidade para as aflatoxinas é de inibição da síntese proteica. Ao ser metabolizada em intermediários epóxidos, estes se ligam ao DNA e ao RNA, prejudicando a polimerase de RNA dependente de DNA, inibindo a síntese de RNA e proteína. Desse modo, pode haver prejuízo para a proliferação e diferenciação de células imunológicas, imunoglobulinas e citocinas (FUNG, CLARK, 2004).

A manifestação clínica aguda da intoxicação por aflatoxinas em humanos, proveniente da ingestão de alimentos contaminados, é uma hepatite aguda, com icterícia, febre baixa, depressão, anorexia e diarreia. Estima-se que a ingestão de 2 a 6 mg/kg/dia de aflatoxina durante um mês produza hepatite. Na histopatologia, observa-se necrose centrolobular e infiltração gordurosa do fígado. A aflatoxicose crônica em humanos está associada com carcinoma hepatocelular (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003; FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010). A coinfeção com o vírus da hepatite B é um importante fator sinérgico que afeta a carcinogenicidade das aflatoxinas. A carcinogênese das aflatoxinas envolve vários mecanismos. O epóxido formado liga-se aos sítios nucleofílicos críticos de DNA e RNA, levando à mutação e subsequente formação de câncer. A aflatoxina pode ativar os proto-oncogenes (c-mys, c-Ha-ras, etc.) e inibir os genes de supressão tumoral (FUNG, CLARK, 2004).

A exposição a micotoxinas é menor em países desenvolvidos, onde as dietas das pessoas são extremamente variadas, provedores comerciais de alimentos oferecem qualidade nos mais altos padrões, há uma legislação com valores máximos tolerados de micotoxinas e a maioria da população obtém alimento desses mercados. Em países em desenvolvimento, as dietas tendem a ser menos variadas, os alimentos podem ser obtidos de subsistência ou de mercados locais que não

prezam pela qualidade e há menor ênfase aos níveis máximos tolerados pela legislação. Ainda, o vírus da hepatite B possui maior prevalência em países em desenvolvimento, potencializando a ação carcinogênica da aflatoxina AFB<sub>1</sub> (SHEPARD, 2008).

## 2.5 LEGISLAÇÃO SOBRE LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS PARA AFLATOXINAS EM ALIMENTOS NO BRASIL

Segundo a Resolução - RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011 (ANVISA, 2011), o limite máximo tolerado de aflatoxinas totais (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) em frutas desidratadas e secas é de 10 µg/kg.

De acordo com a Instrução Normativa nº 9, de 16 de janeiro de 2002 (MAPA, 2002), todas as partidas ou lotes importados de frutas secas somente poderão ser liberados após análise de micotoxinas realizada por laboratório credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nos pontos de ingresso do Brasil, durante o desembarque dos produtos referidos, os fiscais federais agropecuários procederão à amostragem da partida ou do lote e encaminharão as amostras aos laboratórios credenciados, para análise de micotoxinas e emissão do respectivo laudo. O plano de amostragem segue a recomendação do Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2000). A mercadoria só será liberada para comercialização se os resultados das análises laboratoriais comprovarem, por meio de laudo, que os níveis de contaminação por micotoxinas estão de acordo com o limite máximo permitido pela legislação vigente.

Esse controle está previsto no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC/Vegetal), instituído pela Instrução Normativa SDA/MAPA nº 42, de 31 de dezembro de 2008 (MAPA, 2008). O PNCRC/Vegetal tem como função monitorar a qualidade dos produtos de origem vegetal produzidos em todo o território nacional, em relação à ocorrência de resíduos de agrotóxicos e contaminantes químicos e biológicos (micotoxinas). São monitorados produtos de origem vegetal destinados ao mercado interno e à exportação. O subprograma de Produtos Importados tem a sua coleta de amostras na zona primária (portos, postos de fronteira e aeroportos).

As análises são realizadas pelos Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGROs), que são os laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária

e Abastecimento, ou por laboratórios públicos e privados credenciados por este Ministério. Os laboratórios oficiais e credenciados pertencem à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, devendo ter acreditação do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) pela Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, no qual se enquadra o presente laboratório (MAPA, 2008).

## 2.6 ANÁLISE DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS

As aflatoxinas não se distribuem de forma homogênea nos alimentos e rações, podendo ocorrer focos altamente contaminados. Dessa forma, a amostragem é uma etapa muito importante na análise dos alimentos e rações contaminados. Procedimentos de amostragem apropriados reduzem a variabilidade dos resultados. A concentração de aflatoxinas em lotes não pode ser determinada com 100% de certeza, tornando a probabilidade de erros devido à amostragem maior que a do procedimento analítico (REITER et al., 2009).

Os métodos utilizados para a determinação de uma micotoxina são baseados em uma correta extração e etapa de limpeza (clean-up). Essas etapas são essenciais para um protocolo bem sucedido. O método de extração usado para remover a micotoxina da matriz biológica depende da estrutura da toxina. Os metabólitos polares requerem a presença de água, auxiliada pela presença de solventes orgânicos. As toxinas hidrofóbicas, como a aflatoxina, dependem do uso de solventes orgânicos. O procedimento de limpeza usado em um protocolo é o passo mais importante, pois a pureza da amostra afeta a sensibilidade dos resultados. As quantidades vestigiais de uma molécula alvo podem ser mascaradas por compostos interferentes, encontrados não apenas na matriz, mas também nos produtos químicos, materiais e solventes usados na técnica. As vidrarias também devem estar livres de contaminação, como detergentes alcalinos, que podem formar sais com os compostos e resultar em menores taxas de detecção (TURNER et al., 2009).

Os principais métodos de extração utilizados para análise de micotoxinas são extração líquido-líquido, extração por fluido supercrítico e extração em fase sólida. A extração líquido-líquido é baseada na diferença de solubilidade das toxinas em fase aquosa e em solventes orgânicos. Na extração líquido-líquido das aflatoxinas pode ser utilizada uma mistura de água e solvente orgânico, como a acetonitrila, metanol

ou acetona. Na extração com fluido supercrítico é utilizado um fluido, como o CO<sub>2</sub>, por exemplo, para extrair o composto da matriz. Esta técnica não é utilizada para análises de rotina devido ao seu elevado custo. Na extração em fase sólida a toxina fica retida em cartuchos preenchidos com diversos tipos de materiais, sílica gel, fase reversa, troca iônica, carvão ativado e anticorpos específicos para cada micotoxina, como é o caso das colunas de imunoafinidade, técnica amplamente utilizada (IAMANAKA, OLIVEIRA, TANIWAKI, 2010; TURNER et al., 2009).

Vários métodos analíticos são aplicados à análise de micotoxinas. A cromatografia líquida (LC) aplicável com detecção UV ou por fluorescência (FLD) é amplamente utilizada em pesquisa e para a aplicação legal da legislação e regulamentos de segurança alimentar no comércio agrícola internacional. A cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa (GC) também são empregadas para a determinação de micotoxinas. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) se destaca especialmente para determinação de múltiplas toxinas e para fins de confirmação, por sua sensibilidade analítica. Estes métodos cromatográficos convencionais são demorados e de alto custo. Existem outros métodos, baseados principalmente em princípios imunológicos, desenvolvidos e comercializados para análise rápida, como ensaio imunoenzimático (ELISA), fluorimetria direta e polarização de fluorescência (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010).

O método cromatográfico de escolha para a detecção de aflatoxinas é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à detecção de fluorescência (HPLC-FLD); no entanto, as aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> têm uma fluorescência natural fraca, que pode ser melhorada por derivatização pré ou pós-coluna (REITER et al., 2009).

As aflatoxinas podem ser derivadas com ácido trifluoroacético (TFA), iodo ou bromo. No passo de derivação pré-coluna utilizando TFA, AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> são convertidos, devido a hidrólise ácida, nos seus hemiacetais fluorescentes AFB<sub>2a</sub> e AFG<sub>2a</sub>. As aflatoxinas B<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> emitem fluorescência azul e AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, fluorescência verde. Essas características são usadas para identificação e detecção rápidas (REITER et al., 2009).

O HPLC separa os compostos presentes em uma amostra por afinidade desses compostos com uma coluna estacionária e um solvente móvel. Os compostos eluídos da coluna passam por um detector, que quantifica os compostos

específicos da amostra original injetada na coluna (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo se realizou no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), localizado no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria, no município de Santa Maria – RS.

#### 3.2 RECEBIMENTO DE AMOSTRAS

Foram analisadas as amostras de uva passa, ameixa seca, figo seco e damasco seco recebidas no LAMIC, no período de outubro de 2017 a setembro de 2018. As amostras foram importadas, procedentes do controle oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, segundo o plano de amostragem oficial.

#### 3.3 PREPARO DA AMOSTRA E EXTRAÇÃO DA AFLATOXINA

As amostras recebidas passaram por um registro, recebendo o número interno do laboratório, garantindo a confidencialidade. Em seguida, as amostras passaram por um processo de moagem em moedor de carne. O processo de moagem facilita a homogeneização da amostra e a extração da micotoxina, já que aumenta a superfície de contato da amostra com o solvente. Foram pesados 50 gramas das amostras em *blenders*.

Na etapa de extração, foram adicionados às amostras 100 mL de solvente contendo acetonitrila e água ultra-pura (84:16, v/v) e realizada agitação dos *blenders* por 3 minutos, a fim de extrair a micotoxina presente por afinidade molecular com o solvente. As soluções foram filtradas em papel filtro. Foram pipetados 10 mL das soluções filtradas e colocados em tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram colocados no concentrador para secagem do solvente por jato de gás nitrogênio e temperatura de 50 °C. Após secagem, foram realizadas as ressuspensões através do acréscimo de 1 mL de solução acetonitrila, água ultra-pura e ácido acético (840:160:5, v/v) e agitação por 1 minuto em vórtex. As soluções foram passadas

através de cartuchos de sílica gel 60, onde foram acrescentados mais 500 µL da solução de ressuspensão.

### 3.4 DILUIÇÃO DE AMOSTRAS

A diluição das amostras possuem o objetivo de reduzir a amostra obtida inicialmente na etapa de extração a um volume menor, mas representativo da quantidade de aflatoxina existente na amostra. Foram coletados 200 µL das amostras após passarem pelos cartuchos e acrescentados 700 µL do diluente ácido trifluoroacético, ácido acético e água ultra-pura (2:1:7, v/v) em *vials*. Após homogeneização, foi realizada a etapa de derivação em chapa aquecedora a 65 °C por 10 minutos e as amostras foram submetidas à análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção de fluorescência (HPLC-FLD).

### 3.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

O equipamento empregado foi um cromatógrafo Agilent Série 1100 (HP05) acoplado a um detector de fluorescência G1321A (nº de série DE 60555966). Para composição da fase aquosa foi utilizado água ultra-pura e ácido acético (1000:5, v/v). A coluna para separação cromatográfica utilizada foi a Chromolith Performance RP – 18e 100 – 4,6 mm. O limite de detecção para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> foi, respectivamente, 0,42 µg/kg, 0,59 µg/kg, 0,64 µg/kg e 0,88 µg/kg. O limite de quantificação para todas as aflatoxinas foi de 1 µg/kg. Todas as amostras foram analisadas com controles positivos e negativos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 376 amostras de frutas secas, sendo 249 de uva passa, 96 de ameixa, 28 de damasco, e 3 de figo. Todas as amostras se mostraram desprovidas de quantidades detectáveis de aflatoxinas (menor que 1 µg/kg), demonstrando que as frutas secas importadas são alimentos seguros quanto a presença de aflatoxinas. Os resultados negativos podem ser decorrentes de contaminação abaixo do limite de quantificação do método utilizado (1 µg/kg) ou pelo uso de boas práticas agrícolas, como novas tecnologias de secagem e a remoção de frutas danificadas durante o processamento. Outras medidas que contribuem para a redução da contaminação por fungos e presença de micotoxinas são a

utilização de produtos químicos como dióxido de enxofre, metabissulfito de sódio e metabissulfito de potássio, aplicação de fungicida durante o armazenamento e radiação gama (HESHMATI et al., 2017; TRUCKSESS, SCOTT, 2008).

Em contraste, Fernández-Cruz et al. (2010) relataram que a AFB<sub>1</sub> foi detectada em uvas passas no Brasil, Egito, Grécia, Índia e Marrocos em uma faixa de concentrações máximas de 2 a 550 µg/kg. Em figos secos, a aflatoxina foi encontrada em muitas pesquisas. A contaminação de figos com aflatoxina começa durante a secagem ao sol na árvore e continua durante a secagem no solo, e os níveis de AFB<sub>1</sub> encontrados foram de até 63 µg/kg.

A União Europeia (UE) estabelece como limites de aflatoxinas em frutas secas: 2 µg/kg para AFB<sub>1</sub> em frutas secas para consumo humano ou ingrediente alimentício e 4 µg/kg para a soma de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (EC, 2006). Para figos secos, o limite é de 6 µg/kg para AFB<sub>1</sub> e 10 µg/kg para AF totais (EC, 2010). De acordo com o Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (em inglês, Rapid Alert System for Food and Feed - RASFF) da União Europeia, as aflatoxinas foram o tipo de micotoxina mais reportada como alerta na União Europeia em 2017. Em relação à contaminação por aflatoxinas em frutas secas, durante o ano de 2017, houve 76 notificações, entre 61 rejeições de fronteira, 9 informações para atenção e 6 alertas. Todas de decisão de risco sério. Estavam contaminados 72 lotes de figos secos e derivados (variando de 6,9 a 202 µg/kg de AFB<sub>1</sub> e 9,5 a 285 µg/kg de AF totais), 1 lote de farinha de algaroba (13,9 µg/kg de AFB<sub>1</sub> e 14,8 µg/kg de AF totais), 2 lotes de mix de frutas secas (contaminação máxima de AFB<sub>1</sub> de 26 µg/kg e 58 µg/kg de AF totais) e 1 lote de tâmaras secas (5,7 µg/kg de AFB<sub>1</sub> e 6,1 µg/kg de AF totais). A maior parte desses produtos era proveniente da Turquia. Algumas ações tomadas foram a retirada do mercado, recall dos produtos, destruição dos produtos e importação não autorizada (RASFF, 2019).

Kollia, Kanapitsas e Markaki (2014) analisaram vinte e seis amostras de uvas passas do mercado de Atenas e Tebas (Grécia Central) para AFB<sub>1</sub> e encontraram a toxina em 23% das amostras (média de 0,15 µg/kg). Isto vai de encontro ao relatado por Azaiez et al. (2015), que analisaram 228 amostras de tâmaras e frutos secos, entre uvas passas, figos, damascos e ameixas, compradas na Tunísia e Espanha, de origem local e mundial (Turquia, Irã, Chile e Argélia) e encontraram contaminação

por aflatoxinas em 23% das amostras e treze delas continham AFs em níveis que excedem os limites máximos estabelecidos na legislação da UE.

Da mesma forma, Heshmati et al. (2017) analisaram 22 amostras de figos secos e 22 amostras de damascos secos de mercados locais do Irã entre 2015 e 2016 e encontraram AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> em 13 (59,1%), 8 (36,4%), 5 (22,7%) e 4 (18,9%) amostras de figo seco, respectivamente, com concentrações médias de 2,65; 0,74; 0,36 e 0,32 µg/kg, respectivamente. A incidência mais frequente de AFB<sub>1</sub> foi encontrada em damascos, pois 18 (81,8%) das 22 amostras estavam contaminadas com níveis que variaram entre 0,39 e 7,1 µg/kg, com média de 2,43 µg/kg.

## **5 CONCLUSÃO**

Nenhuma amostra apresentou níveis detectáveis de aflatoxinas, demonstrando que as frutas secas importadas são alimentos seguros quanto a presença de aflatoxinas. Devido à toxicidade das aflatoxinas, esse controle é de suma importância para a saúde pública.

## REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L. et al. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from Spanish market. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 3, p. 504–506, 2003.
- ] – ANVISA. RDC n. 07, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 mar. 2011, n. 46. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC\\_07\\_2011\\_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966)>. Acesso em: 24 set. 2018.
- AZAIÉZ, I. et al. Survey of mycotoxins in dates and dried fruits from Tunisian and Spanish markets. **Food Control**, v. 51, p. 340-346, 2015.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in dried figs**. Doc. Ref. CAC/RCP. 65–2008, 2008.
- CORRÊA, B. **Fungos toxigênicos: panorama nacional**. Florianópolis: Vildes M. Scussel, 2000.
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 2003. 216 p.
- DRUSCH, S.; RAGAB, W. Mycotoxins in fruits, fruit juices and dried fruits. **Journal of Food Protection**, v. 66, n.8, p. 1514–1527, 2003.
- EC. Commission Regulation (EC) n. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L364, p. 5-24, 2006.
- EC. Commission Regulation (EU) n. 1058/2012 of 12 November 2012 amending Regulation (EC) n. 1881/2006 as regards maximum levels for aflatoxins in dried figs. **Official Journal of the European Union**, L313, p. 14-15, 2010.
- FACCA, M.C.L.; DALZOTO, P.R. Aflatoxinas: Um Perfil da Situação do Amendoim e Derivados no Cenário Brasileiro. **Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.25-29, jan./jun., 2010.
- FAO/WHO. **Codex Alimentarius**. Roma: v. 2, 2000.
- FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L. et al. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. **Journal of Advanced Research**, v. 1, p. 113–122, 2010.

FUNG, F.; CLARK, R.F. Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 217–234, 2004.

GÜNSEN, U.; BUYUKYORUK, I. Aflatoxins in retail products in Bursa, Turkey. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, p. 289-290, 2002.

HESHMATI, A. et al. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits in Iran: Dietary exposure risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 202-208, 2017.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Review: toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n. 2, p.101-134, 2001.

IAMANAKA, B. T. et al. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 12, p. 1258–1263, dez. 2005.

IAMANAKA, B. T. et al. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. **Food Control**, v.18, p.454–457, 2007.

IAMANAKA, B.T.; OLIVEIRA, I.S.; TANIWAKI, M.H. Micotoxinas em Alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 7, p.138-161, 2010.

IARC. Aflatoxins. **IARC Monographs**, v. 100 F, p. 225-248, 2012.

IC, E. et al. Electron beam radiation of dried fruits and nuts to reduce yeast and mold bioburden. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 4, p. 981–985, 2007.

KABAK, B. Aflatoxins in hazelnuts and dried figs: occurrence and exposure assessment. **Food Chemistry**, v. 211, p. 8–16, 2016.

KABAK, B. The fate of mycotoxins during thermal food processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 4, p. 549–54, 2009.

KABAK, B.; DOBSON, A. D. W. Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 9, p. 2006–2016, 2009.

KABAK, B.; DOBSON, A. D. W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 8, p. 593-619, 2006.

KARACA, H.; VELIOGLU, Y.S.; NAS, S. Mycotoxins: contamination of dried fruits and degradation by ozone. **Toxin Reviews**, v. 29, p. 51-59, 2010.

KAWASHIMA, L. M. **Micotoxinas em Alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2004. 110 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.

KOLLIA, E.; KANAPITSAS, A.; MARKAKI, P. Occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in dried vine fruits from Greek market. **Food Additives and Contaminants**, Part B, v. 7, n. 1, p. 11-16, 2014.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Environmental fluxes and fungal interactions: maintaining a competitive edge. In: VAN WEST, P.; AVERY, S.; STRATFORD, M. (Eds.). **Stress in yeasts and filamentous fungi**. Amsterdam, Holand: Elsevier, 2007. cap. 2, p. 19–35.

MALLMANN, C.A. et al. Aflatoxinas em nozes e frutas secas comercializadas no Brasil. In: XIII ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 2003, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Instrução Normativa n. 9, de 16 de janeiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, 17 jan. 2002. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/normativos-dipov/INn092002afla.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Instrução Normativa n. 42, de 31 de dezembro de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, 5 jan. 2009. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pncrc-vegetal/arquivos/00-in-sda-42-2008.pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

NOUARA, A. M. et al. *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in dried figs and nuts in Algeria, **Food Additives and Contaminants**: Part B, 11:2, 119-125, 2018.

ORSAT, V.; CHANGRUE, V.; RAGHAVAN, G. S. V. Microwave drying of fruits and vegetables. **Stewart Post-Harvest Ver**, v. 6, p. 4–9, 2006.

OZER, H.; BASEGMEZ, H. I. O; OZAY, G. Mycotoxin risks and toxigenic fungi in date, prune and dried apricot among Mediterranean crops. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 51, n. 1, p. 148-157, 2012.

RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED – RASFF. **RASFF Portal**. Disponível em: < <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

REITER, E. et al. Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n.4, p.508–524, 2009.

SAGAR, V. R.; SURESH, K. P. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n.1, p.15–26, jan./fev. 2010.

SCHMIDT-HEYDT, M. et al. The production of aflatoxin B<sub>1</sub> or G<sub>1</sub> by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. **Mycotoxin Research**, v. 26, p. 241–246, 2010.

SHEPHARD, G. S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 146-151, 2008.

SILVA, J.O. **Ocorrência de aflatoxina B<sub>1</sub> em arroz consumido por militares do exército brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência**. 2005. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SMITH, J. S.; PILLAI, S. D. Irradiation and food safety. **Food Technology**, v. 58, p.48–55, 2004.

TRUCKSESS, M.W.; SCOTT, P.M. Mycotoxins in botanicals and dried fruits: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p.181–192, 2008.

TURNER, N.W. et al. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 168–180, 2009.

ZORLUGENC, B. et al. The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> in dried figs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3593–3597, 2008.

1 **ARTIGO** (Conforme as normas da revista CIÊNCIA RURAL)

2  
3 **Ocorrência de aflatoxinas em amostras de frutas secas no período de outubro de 2017 a**  
4 **setembro de 2018**

5 **Occurrence of aflatoxins in samples of dried fruits from october 2017 to september 2018**

6  
7 **Ana Beatriz Benevides de Freitas<sup>I\*</sup> Paulo Dilkin<sup>II</sup> Maristela Lovato<sup>II</sup>**

8  
9 **RESUMO**

10 Este estudo teve como objetivo analisar a ocorrência de aflatoxinas em amostras de  
11 frutas secas importadas pelo Brasil no período de outubro de 2017 a setembro de 2018  
12 utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção de fluorescência.  
13 Foram analisadas 376 amostras de frutas secas, sendo 249 de uva passa, 96 de ameixa, 28 de  
14 damasco e 3 de figo. Nenhuma amostra apresentou níveis detectáveis de aflatoxinas,  
15 demonstrando que as frutas secas importadas são alimentos seguros quanto a presença de  
16 aflatoxinas.

17  
18 **Palavras-chave:** Aflatoxinas. Frutas Secas. Micotoxinas.

19  
20 **ABSTRACT**

21 This study aimed to analyze the occurrence of aflatoxins in dried fruit samples  
22 imported by Brazil from October 2017 to September 2018 using high performance liquid

---

<sup>I\*</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: anabeatriz.ufsm@gmail.com. Autor para correspondência.

<sup>II</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

1 chromatography with fluorescence detection. A total of 376 dried fruit samples were  
2 analyzed, 249 of which were raisins, 96 of plum, 28 of apricots and 3 of figs. No sample had  
3 detectable levels of aflatoxins, demonstrating that imported dried fruits are safe foods for the  
4 presence of aflatoxins.

5

6 **Key words:** Aflatoxins. Dried fruits. Mycotoxins.

7

## 8 INTRODUÇÃO

9 Aflatoxinas são um grupo de micotoxinas estruturalmente semelhantes, altamente  
10 mutagênicas, que contaminam produtos agrícolas. São produzidas por fungos do gênero  
11 *Aspergillus*, sobretudo por *A. flavus* e *A. parasiticus* (KAWASHIMA, 2004). Altas  
12 temperaturas (27 – 38°C), atividade de água (*Aw*) de 0,99 e alta umidade relativa (85%)  
13 favorecem o crescimento de *Aspergillus* no campo. As aflatoxinas são produzidas sob certas  
14 condições consideradas estressantes para o fungo que incluem temperatura 13 – 40°C (ótima  
15 30°C) e *Aw* de 0,95 (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010). As aflatoxinas têm sido detectadas  
16 em sementes de culturas de extrema importância econômica, como o milho, amendoim,  
17 feijão, arroz, trigo, algodão, sorgo, e também em frutas (CORRÊA, 2000).

18 As micotoxinas mais comumente encontradas em frutas e seus produtos processados  
19 são aflatoxinas, ocratoxina A, patulina e toxinas de *Alternaria* (DRUSCH, RAGAB, 2003;  
20 FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010).

21 A exposição às aflatoxinas pode causar problemas imunológicos, distúrbios  
22 hematopoiéticos como síndromes de hemorragia anêmica e danos significativos ao fígado  
23 (efeitos hepatotóxicos) (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND  
24 TECHNOLOGY, 2003). As aflatoxinas são classificadas pela Agência Internacional de  
25 Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como carcinogênicas para humanos (grupo 1) (IARC, 2012).

1 Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Resolução - RDC  
2 nº 07, de 18 de fevereiro de 2011), o limite máximo tolerado de aflatoxinas totais ( $AFB_1 +$   
3  $AFB_2 + AFG_1 + AFG_2$ ) em frutas desidratadas e secas no Brasil é de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

4 De acordo com a Instrução Normativa nº 9, de 16 de janeiro de 2002 (MAPA, 2002),  
5 todas as partidas ou lotes importados frutas secas somente poderão ser liberados após análise  
6 de micotoxinas realizada por laboratório credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária  
7 e Abastecimento, que deve estar de acordo com o limite máximo permitido pela legislação  
8 vigente.

9 O objetivo deste estudo foi analisar a ocorrência de aflatoxinas em 376 amostras de  
10 frutas secas (uva passa, ameixa, damasco e figo) importadas pelo Brasil no período de outubro  
11 de 2017 a setembro de 2018 utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à  
12 detecção de fluorescência.

## 14 MATERIAL E MÉTODOS

15 As amostras de frutas secas analisadas foram importadas pelo Brasil e chegaram ao  
16 Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), localizado em Santa Maria - RS, no  
17 período de outubro de 2017 a setembro de 2018. Foram analisadas 376 amostras de frutas  
18 secas, sendo 249 de uva passa, 96 de ameixa, 28 de damasco, e 3 de figo.

19 As amostras recebidas foram moídas em moedor de carne para homogeneização da  
20 amostra e aumento da superfície de contato. Foram pesados 50 gramas da amostra em um  
21 “blender”.

22 Para a extração da aflatoxina, foi adicionado ao “blender” 100mL de solvente  
23 contendo acetonitrila e água ultra-pura (84:16, v/v) e agitado por 3 minutos. A solução foi  
24 filtrada em papel filtro (poro de 14 $\mu\text{m}$ ) e do filtrado foram pipetados 10mL em tubo de  
25 ensaio. O tubo de ensaio foi submetido à secagem em concentrador (Agilent Nitrogen

1 Generator) por jato de gás nitrogênio e temperatura de 50°C. Após a secagem, foi realizada a  
2 ressuspensão através do acréscimo de 1mL da solução acetonitrila, água ultra-pura e ácido  
3 acético (840:160:5, v/v) e agitação por 1 minuto em vórtex. A solução passa através de um  
4 cartucho de sílica gel 60, onde são acrescentados mais 500µL da solução de ressuspensão.

5 Em seguida, foi realizada diluição da amostra ressuspendida: 200µL são colocados  
6 em vial e acrescentados 700µL do diluente ácido trifluoroacético, ácido acético e água ultra-  
7 pura (2:1:7, v/v). Após homogeneização, foi realizada a derivatização por 10 minutos a 65°C e  
8 submetido à cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à detecção de fluorescência  
9 (HPLC-FLD). O equipamento empregado foi um cromatógrafo Agilent Série 1100 (HP05)  
10 acoplado a um detector de fluorescência G1321A (nº de série DE 60555966). Para  
11 composição da fase aquosa foi utilizado água ultra-pura e ácido acético (1000:5, v/v). A  
12 coluna para separação cromatográfica utilizada foi a Chromolith Performance RP – 18e 100 –  
13 4,6mm. O limite de detecção para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> é, respectivamente, 0,42µg/kg,  
14 0,59µg/kg, 0,64µg/kg e 0,88µg/kg. O limite de quantificação para todas as aflatoxinas é de  
15 1µg/kg. Todas as amostras correram com controles positivos e negativos.

16

## 17 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

18 Nenhuma amostra apresentou níveis detectáveis de aflatoxinas, demonstrando que as  
19 frutas secas importadas são alimentos seguros quanto a presença de aflatoxinas. Os resultados  
20 negativos podem ser decorrentes de contaminação abaixo do limite de quantificação do  
21 equipamento (1µg/kg) ou pelo uso de boas práticas agrícolas, como novas tecnologias de  
22 secagem e a remoção de frutas danificadas durante o processamento. Outras medidas que  
23 contribuem para a redução da contaminação por fungos e presença de micotoxinas são a  
24 utilização de produtos químicos como dióxido de enxofre, metabissulfito de sódio e

1 metabissulfito de potássio, aplicação de fungicida durante o armazenamento e radiação gama  
2 (HESHMATI et al., 2017; TRUCKSESS, SCOTT, 2008).

3 Em contraste, Fernández-Cruz et al. (2010) relataram que a AFB<sub>1</sub> foi detectada em  
4 uvas passas no Brasil, Egito, Grécia, Índia e Marrocos em uma faixa de concentrações  
5 máximas de 2 a 550µg/kg. Em figos secos, a aflatoxina foi encontrada em muitas pesquisas. A  
6 contaminação de figos com aflatoxina começa durante a secagem ao sol na árvore e continua  
7 durante a secagem no solo, e os níveis de AFB<sub>1</sub> encontrados foram de até 63µg/kg.

8 A União Europeia (UE) estabelece como limites de aflatoxinas em frutas secas:  
9 2µg/kg para AFB<sub>1</sub> em frutas secas para consumo humano ou ingrediente alimentício e 4µg/kg  
10 para a soma de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (EC, 2006). Para figos secos, o limite é de 6µg/kg  
11 para AFB<sub>1</sub> e 10µg/kg para AF totais (EC, 2010). De acordo com o Sistema de Alerta Rápido  
12 para Alimentos e Rações (em inglês, Rapid Alert System for Food and Feed - RASFF) da  
13 União Europeia, as aflatoxinas foram o tipo de micotoxina mais reportada como alerta na  
14 União Europeia em 2017. Em relação à contaminação por aflatoxinas em frutas secas, durante  
15 o ano de 2017, houve 76 notificações, entre 61 rejeições de fronteira, 9 informações para  
16 atenção e 6 alertas. Todas de decisão de risco sério. Estavam contaminados 72 lotes de figos  
17 secos e derivados (variando de 6,9 a 202µg/kg de AFB<sub>1</sub> e 9,5 a 285µg/kg de AF totais), 1 lote  
18 de farinha de algaroba (13,9µg/kg de AFB<sub>1</sub> e 14,8µg/kg de AF totais), 2 lotes de mix de frutas  
19 secas (contaminação máxima de AFB<sub>1</sub> de 26µg/kg e 58µg/kg de AF totais) e 1 lote de tâmaras  
20 secas (5,7µg/kg de AFB<sub>1</sub> e 6,1µg/kg de AF totais). A maior parte desses produtos era  
21 proveniente da Turquia. Algumas ações tomadas foram a retirada do mercado, recall dos  
22 produtos, destruição dos produtos e importação não autorizada (RASFF, 2019).

23 Kollia, Kanapitsas e Markaki (2014) analisaram vinte e seis amostras de uvas passas  
24 do mercado de Atenas e Tebas (Grécia Central) para AFB<sub>1</sub> e encontraram a toxina em 23%  
25 das amostras (média de 0,15µg/kg). Isto vai de encontro ao relatado por Azaiez et al. (2015),

1 que analisaram 228 amostras de tâmaras e frutos secos, entre uvas passas, figos, damascos e  
2 ameixas, compradas na Tunísia e Espanha, de origem local e mundial (Turquia, Irã, Chile e  
3 Argélia) e encontraram contaminação por aflatoxinas em 23% das amostras e treze delas  
4 continham aflatoxinas em níveis que excedem os limites máximos estabelecidos na legislação  
5 da UE.

6 Da mesma forma, Heshmati et al. (2017) analisaram 22 amostras de figos secos e 22  
7 amostras de damascos secos de mercados locais do Irã entre 2015 e 2016 e encontraram  
8 AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> em 13 (59,1%), 8 (36,4%), 5 (22,7%) e 4 (18,9%) amostras de figo  
9 seco, respectivamente, com concentrações médias de 2,65; 0,74; 0,36 e 0,32µg/kg,  
10 respectivamente. A incidência mais frequente de AFB<sub>1</sub> foi encontrada em damascos, pois 18  
11 (81,8%) das 22 amostras estavam contaminadas com níveis que variaram entre 0,39 e  
12 7,1µg/kg, com média de 2,43µg/kg.

13

## 14 **CONCLUSÃO**

15 Nenhuma amostra apresentou níveis detectáveis de aflatoxinas, demonstrando que as  
16 frutas secas importadas são alimentos seguros quanto a presença de aflatoxinas. Devido à  
17 toxicidade das aflatoxinas, esse controle é de suma importância para a saúde pública.

18

## 19 **REFERÊNCIAS**

20

21 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. RDC n. 07, de 18 de  
22 fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 mar. 2011, n. 46. Disponível em:  
23 <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC\\_07\\_2011\\_COMP.pdf/afe3f054-  
bc99-4e27-85c4-780b92e2b966](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-<br/>24 bc99-4e27-85c4-780b92e2b966)>. Acesso em: 24 set. 2018.

- 1 AZAIEZ, I. et al. Survey of mycotoxins in dates and dried fruits from Tunisian and Spanish  
2 markets. **Food Control**, v. 51, p. 340-346, 2015.
- 3 CORRÊA, B. **Fungos toxigênicos: panorama nacional**. Florianópolis: Vildes M. Scussel,  
4 2000.
- 5 COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: risks in**  
6 **plant, animal, and human systems**. Ames: Council for Agricultural Science and  
7 Technology, 2003. 216 p.
- 8 DRUSCH, S.; RAGAB, W. Mycotoxins in fruits, fruit juices and dried fruits. **Journal of**  
9 **Food Protection**, v. 66, n.8, p. 1514–1527, 2003. Disponível em: <  
10 <https://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-66.8.1514>>. Acesso em: 07 fev. 2019.
- 11 EC. Commission Regulation (EC) n. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum  
12 levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**,  
13 L364, p. 5-24, 2006. Disponível em: < [https://eur-](https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF)  
14 [lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF](https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF)>. Acesso  
15 em: 7 fev. 2019.
- 16 EC. Commission Regulation (EU) n. 1058/2012 of 12 November 2012 amending Regulation  
17 (EC) n. 1881/2006 as regards maximum levels for aflatoxins in dried figs. **Official Journal of**  
18 **the European Union**, L313, p. 14-15, 2010. Disponível em: <  
19 [https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg1058\\_2012.pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg1058_2012.pdf)>. Acesso em: 7 fev. 2019.
- 20 FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L. et al. Mycotoxins in fruits and their processed products:  
21 Analysis, occurrence and health implications. **Journal of Advanced Research**, v. 1, p. 113–  
22 122, 2010. Disponível em: < [https://ac.els-cdn.com/S2090123210000330/1-s2.0-](https://ac.els-cdn.com/S2090123210000330/1-s2.0-S2090123210000330-main.pdf?_tid=787637ef-c1f7-41d2-b8ec-69aae63d8249&acdnat=1549570936_2bf4ec74b155bef9f3a2f5bb460d698e)  
23 [S2090123210000330-main.pdf?\\_tid=787637ef-c1f7-41d2-b8ec-](https://ac.els-cdn.com/S2090123210000330-main.pdf?_tid=787637ef-c1f7-41d2-b8ec-69aae63d8249&acdnat=1549570936_2bf4ec74b155bef9f3a2f5bb460d698e)  
24 [69aae63d8249&acdnat=1549570936\\_2bf4ec74b155bef9f3a2f5bb460d698e](https://ac.els-cdn.com/S2090123210000330/1-s2.0-S2090123210000330-main.pdf?_tid=787637ef-c1f7-41d2-b8ec-69aae63d8249&acdnat=1549570936_2bf4ec74b155bef9f3a2f5bb460d698e)>. Acesso em: 7  
25 fev. 2019. doi: 10.1016/j.jare.2010.03.002.

- 1 HESHMATI, A. et al. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits in Iran:  
2 Dietary exposure risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 202-208, 2017.  
3 Disponível em: <  
4 [https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0278691517302806?token=6B6B86AD981C81671](https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0278691517302806?token=6B6B86AD981C81671B28EF79FDD3DDF20AAEC7A3A7BCEC7AAE72F9D946AE46ACEBE55A0A730223E4AEF61DEE6F09B82D)  
5 [B28EF79FDD3DDF20AAEC7A3A7BCEC7AAE72F9D946AE46ACEBE55A0A730223E4](https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0278691517302806?token=6B6B86AD981C81671B28EF79FDD3DDF20AAEC7A3A7BCEC7AAE72F9D946AE46ACEBE55A0A730223E4AEF61DEE6F09B82D)  
6 [AEF61DEE6F09B82D](https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0278691517302806?token=6B6B86AD981C81671B28EF79FDD3DDF20AAEC7A3A7BCEC7AAE72F9D946AE46ACEBE55A0A730223E4AEF61DEE6F09B82D)>. Acesso em: 7 fev. 2019. doi: 10.1016/j.fct.2017.05.046
- 7 IARC. Aflatoxins. **IARC Monographs**, v. 100 F, p. 225-248, 2012.
- 8 KAWASHIMA, L. M. **Micotoxinas em Alimentos e bebidas nacionais produzidos e**  
9 **comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2004. 110 p. Tese (Doutorado em Ciência  
10 de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas,  
11 Campinas, SP, 2004.
- 12 KOLLIA, E.; KANAPITSAS, A.; MARKAKI, P. Occurrence of aflatoxin B1 and ochratoxin  
13 A in dried vine fruits from Greek market. **Food Additives and Contaminants, Part B**, v. 7, n.  
14 1, p. 11-16, 2014. Disponível em: <  
15 <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/19393210.2013.825647?needAccess=true>>.  
16 Acesso em: 7 fev. 2019. doi: 10.1080/19393210.2013.825647
- 17 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Instrução  
18 Normativa n. 9, de 16 de janeiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, 17 jan.  
19 2002. Disponível em: < [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/normativos-dipov/INn092002afla.pdf)  
20 [vegetal/normativos-dipov/INn092002afla.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/normativos-dipov/INn092002afla.pdf)>. Acesso em: 18 nov. 2018.
- 21 RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED – RASFF. **RASFF Portal**. Disponível  
22 em: < [https://webgate.ec.europa.eu/rasff-](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1)  
23 [window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1)>. Acesso em: 28 jan. 2019.
- 24 TRUCKSESS, M.W.; SCOTT, P.M. Mycotoxins in botanicals and dried fruits: a review.  
25 **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p.181–192, 2008. Disponível em: <

- 1 <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/02652030701567459?needAccess=true>>.
- 2 Acesso em: 7 fev. 2019. doi: 10.1080/02652030701567459.