



Vera Carina Costa do Alvar

O Alternariol em Alimentos de Origem Vegetal

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Vera Carina Costa do Alvar

O Alternariol em Alimentos de Origem Vegetal

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Vera Carina Costa do Alvar, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010127070, 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, 11 de Setembro de 2015.

O Orientador da Monografia

Professora Doutora Celeste de Matos Lino

____/____/____

(Data)

(Carimbo)

Índice

Abreviaturas e Acrónimos	2
Resumo	4
Abstract	4
Introdução	5
Alternariol	6
Caraterísticas físico-químicas	9
Toxicocinética	9
Absorção e Metabolização	10
Distribuição e Excreção	10
Incidência	11
Metodologias Analíticas	14
Estratégias de diminuição de micotoxinas em alimentos	17
Conclusão	18
Bibliografia	19

Abreviaturas e Acrónimos

ACN – acetoneitrilo

ADN – ácido desoxirribonucleico

ALT – alternariol

AME – éter monometílico do alternariol

AOH – alternariol

APCI – ionização química à pressão atmosférica

AS – altenuisol

ATX (I, II, III) – alterotoxinas (I, II, III)

a_w – atividade da água

CAS – Chemical Abstracts Service

CH₃COOH – ácido acético

DAD – detetor díodo em série

DCM – diclorometano

DMSO – dimetil-sulfóxido

EFSA – European Food Safety Authority

ESI – ionização por electro spray

Abreviaturas e Acrónimos

EtOAc – acetato de etilo

HCT 116 – células do carcinoma humano do cólon

H₂O – água

HPLC – cromatografia líquida de alta pressão

I.V. – intravenoso

KCl – cloreto de potássio

LC – cromatografia líquida

LD₅₀ – dose letal a 50%

LPO – peroxidação de lípidos

MeOH – metanol

MS/MS – detetor de massa em tandem

ROS – espécies reativas de oxigénio

SPE – extração em fase sólida

TeA – ácido tenuazóico

UPLC – cromatografia líquida de ultra pressão

ZnSO₄•H₂O – sulfato de zinco hidratado

Resumo

O alternariol (AOH) é uma micotoxina produzida pelo género *Alternaria* e que revela evidências de riscos para a saúde humana, contaminando produtos destinados ao consumo humano e animal, como mostram os dados recolhidos pela EFSA.

O objetivo deste trabalho é elaborar uma revisão sobre a incidência do AOH em diferentes tipos de produtos de origem vegetal, um pouco por todo o Mundo, os métodos analíticos disponíveis para a sua deteção e quantificação, bem como estratégias a adotar para a diminuição da presença de micotoxinas em alimentos.

Como tal, o desenvolvimento destes métodos analíticos é essencial, sendo que método de eleição dos investigadores o HPLC – MS/MS ou UPLC – MS/MS.

Em suma, é necessário monitorizar a sua ocorrência ao longo de toda a cadeia de produção alimentar e com métodos analíticos específicos e sensíveis.

Abstract

Alternariol (AOH) is a mycotoxin produced by the genus *Alternaria* and reveals evidence of risks to human health, contaminating food and feed, as shown by the data collected by EFSA.

The aim of this study is to review the impact of the AOH in different types of vegetable products, all over the world, the analytical methods available for its detection and quantification, as well as adopted strategies to decrease the presence of the mycotoxins in foods.

As such, the development of these analytical methods are essential and HPLC - MS / MS or UPLC - MS / MS was the preferred method for researchers.

Thus, it is necessary to monitor its occurrence in the food production chain with specific and sensitive analytical methods.

Introdução

As alterações climáticas e o aquecimento global poderão estar na origem do aumento do microbioma em produtos alimentares, podendo resultar num impacto negativo a nível da sua qualidade e segurança (Vučković *et al.*, 2012).

As micotoxinas são metabolitos secundários fúngicos, biologicamente ativos, encontrados em alimentos destinados a humanos e animais como contaminantes (Chiesi *et al.*, 2015).

A contaminação com múltiplas micotoxinas nos produtos alimentares predominantemente consumidos, como cereais e derivados, podem exercer problemas graves na saúde dessas populações consumidoras (Abia *et al.*, 2013).

O género *Alternaria* spp. é classificado como Fungos Imperfeitos (*Deuteromycotina*) e reproduzem-se assexuadamente, através de conídios (Asam, Konitzer & Rychlik, 2011). Estas espécies de fungos são ubíquas no meio ambiente, podendo estar presentes nos solos, em plantas, em produtos alimentares, entre outros (Vučković *et al.*, 2012).

Tem sido descrito, em todo o mundo, que o género *Alternaria* infeta as culturas no campo e provoca a deterioração pós-colheita de muitos produtos de origem vegetal (Vučković *et al.*, 2012). A sua ocorrência em vários frutos, cereais e vegetais faz com que este patogénico seja considerado tão perigoso como outros já extensamente estudados, como o *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., e *Fusarium* spp. (Prelle *et al.*, 2013).

As plantas infetadas com *Alternaria* mostram pontos pretos, doença chamada de “*black point*” nos frutos, folhas e caules, apodrecimento de tubérculos e frutas e nos cereais é comum surgirem manchas negras (Figura 1) (Asam *et al.*, 2011). Para além disto, *Alternaria* spp. também apresenta patogenicidade pós-colheita, provocando deterioração dos produtos durante o transporte, armazenamento e processamento, o que leva a perdas económicas graves,

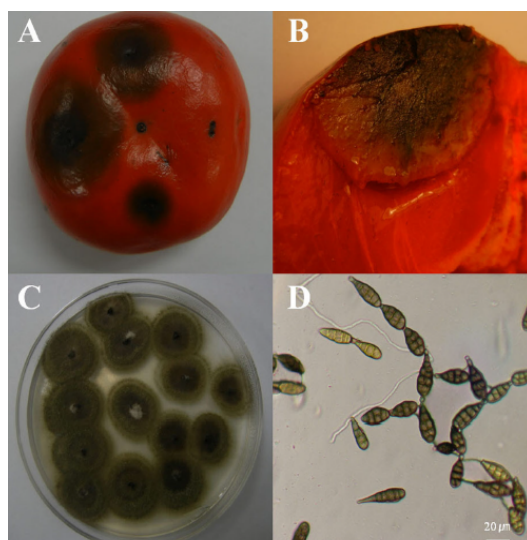


Figura 1 – Características morfológicas e sinais de *Diospyros kaki* L. provocado por *Alternaria alternata*.

A – pontos pretos no diospiro; B – Plano da seção vertical da lesão; C – colónia em agar de dextrose de batata; D – Conídios

Adaptado de Lee *et al.*, 2013

principalmente pela redução da qualidade, devido à descoloração, insipidez e diminuição do valor nutritivo (Vučković et al., 2012).

As espécies de *Alternaria* revelam grande importância na segurança e qualidade de produtos alimentares, bem como na saúde humana, nomeadamente pelo facto de os seus esporos serem considerados um dos alergénios fúngicos mais proliferativos, os quais foram associados a alergias respiratórias e infeções cutâneas (Vučković et al., 2012).

São produzidas mais de 70 micotoxinas e fitotoxinas pelo género *Alternaria*, mas só algumas ocorrem naturalmente nos alimentos ou apresentam relevância toxicológica. Das espécies produtoras de toxinas, a *Alternaria alternata* é considerada a mais importante (Vučković et al., 2012).

A *Alternaria alternata* produz compostos que são seletivamente tóxicos para hospedeiros-específicos, tais como maçãs, tomates, entre outros (Müller & Korn, 2013).

Alternariol

Uma vez que o género *Alternaria* é comumente parasita de plantas e possível responsável pela deterioração de frutos e vegetais durante o transporte e armazenamento (Fernández-Cruz, Mansilla & Tadeo, 2010)), torna-se importante avaliar a sua incidência e respetivas toxinas nos produtos alimentares, com elevados padrões de consumo.

Assim, as toxinas mais importantes produzidas por *Alternaria* encontram-se divididas em três principais classes estruturais (Figura 2) (Müller et al., 2013):

- a) Derivados dibenzo- α -pirona: alternariol (AOH), éter monometílico de alternariol (AME), altenueno (ALT), altenuisol AS);
- b) Derivados do ácido tetramico: ácido tenuazóico (TeA);
- c) Derivados perilenos: alterotoxinas I, II, III (ATX-I, -II, -III).

O altenueno (ALT) e ATX-I foram os que demonstraram produzir a maior toxicidade aguda no ratinho com LD₅₀ de 50 e 200 mg/Kg, respetivamente. As micotoxinas AOH e AME não apresentaram elevada toxicidade aguda no ratinho (LD₅₀ 400 mg/Kg), enquanto o TeA demonstrou toxicidade sub-aguda no ratinho (LD₅₀ i.v. 115 mg/Kg) (Fernández-Cruz et al., 2010).

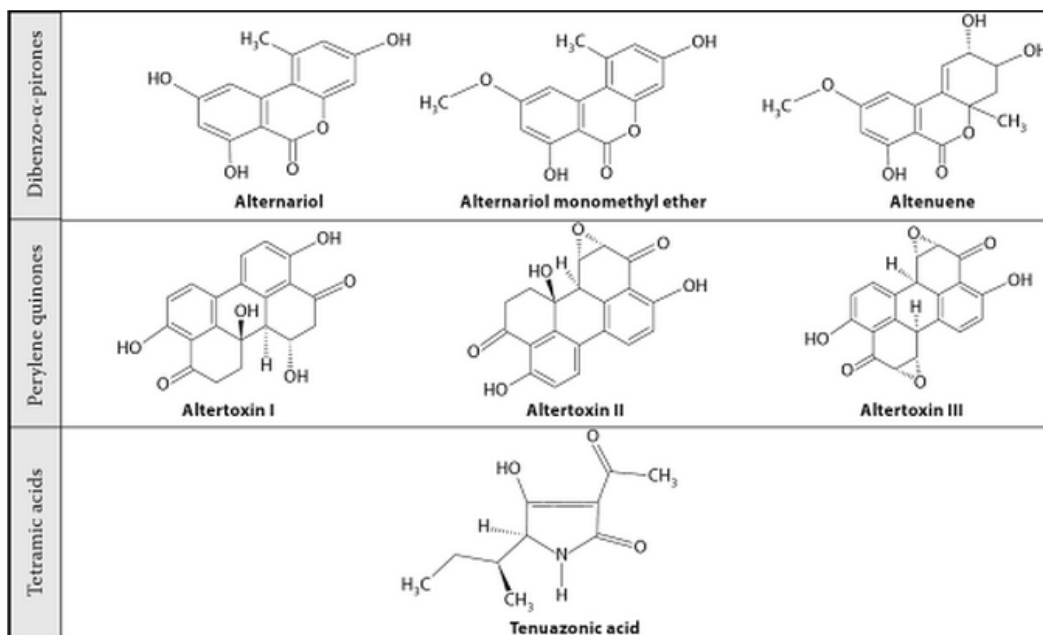


Figura 2 - Estruturas químicas de AOH; AME; ALT; ATX – I; ATX – II; ATX – III e TeA

Adaptado de Pavón *et al.*, 2016.

Apesar da baixa toxicidade aguda exibida pela maioria destas micotoxinas, tem sido demonstrado que extratos de *Alternaria alternata* são genotóxicos e mutagênicos *in vitro* (Chiesi *et al.*, 2015). Estas toxinas demonstram atividade citotóxica, fetotóxica e/ou teratogênica, e são também mutagênicas e clastogênicas em sistemas de células microbióticas e de mamíferos, sendo tumorigênicas em murganhos, por inibir a proliferação celular (Müller *et al.*, 2013).

Tem também sido sugerido que a produção de AOH e AME por *Alternaria alternata* em cereais pode ser o fator responsável pelo aumento da incidência do carcinoma do esôfago na China (Prelle *et al.*, 2013).

Apesar do potencial risco para a saúde dos consumidores, bem como da sua ocorrência natural em produtos alimentares estarem demonstrados, até agora ainda não há regulações internacionais específicas para nenhuma micotoxina de *Alternaria* em alimentos destinados ao consumo humano e animal (Müller *et al.*, 2013).

Assim, e porque as toxinas de *Alternaria* podem ser encontradas num enorme número de produtos comerciais, como sumos de maçã, derivados de tomate, cereais, cervejas e cenouras, é necessário monitorizar a sua ocorrência na cadeia de produção alimentar através de métodos analíticos específicos (Prelle *et al.*, 2013).

Dos metabolitos secundários de fungos *Alternaria*, o AOH e o AME são considerados os principais metabolitos tóxicos (Fernández-Blanco *et al.*, 2014).

As características dos extratos de *Alternaria*, referidas acima, são imputadas também ao AOH, sendo assim um dos principais responsáveis por essas atividades dos extratos. Assim torna-se relevante a caracterização e pesquisa deste composto.

Para além das propriedades atribuídas, o AOH e AME são referidos em evidências recentes como inibidores da topoisomerase I e II, o qual pode causar danos no ADN em cultura de células (Fernández-Blanco *et al.*, 2014). Foi também observado que uma concentração de AOH compreendida entre 15 – 30 μM bloqueia quase completamente a proliferação celular (Solhaug *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm sugerido que o AOH pode atuar como um desregulador endócrino (pode interferir com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação, eliminação de hormonas naturais no organismo que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento (Frizzell *et al.*, 2013).

Esta micotoxina é um composto difenólico estruturalmente semelhante ao estrogénio natural e sintético. Trata-se de uma substância mimetizante e neste contexto a sua capacidade para atuar como um agonista dos recetores de estrogénio foi confirmada (Lehmann *et al.*, 2006). Foi ainda descrito que AOH e AME demonstraram diminuir a síntese da hormona esteróide progesterona, a qual possui um papel importante na regulação da fertilidade feminina (Frizzell *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que as células do carcinoma humano do cólon (HCT116) são sensíveis ao AOH, e que este induz uma diminuição da viabilidade destas células, de uma forma dependente da concentração. Para além disto, encontraram o valor de DL_{50} de 65 μM após 24 horas de exposição (Bensassi *et al.*, 2012). Por este motivo é importante a obtenção de dados de exposição crónica às micotoxinas, de modo a avaliar o potencial toxicológico destas.

Embora a citotoxicidade do AOH seja baixa quando comparada com outras micotoxinas mais proeminentes, é relevante no contexto de frutos e produtos à base de cereais (Chiesi *et al.*, 2015).

Relativamente ao stress oxidativo provocado pela presença de alternariol, foi verificado que a hidroxilação do AOH leva à formação de espécies reativas de oxigénio

(ROS), que por sua vez, em excesso, pode levar a stress oxidativo. Esta produção de ROS demonstra implicações na proliferação celular em células Caco-2 de forma concentração e tempo- dependente. Em resumo, o AOH produz alterações nos marcadores de stress oxidativo e dos antioxidantes de defesa e este desequilíbrio no metabolismo de ROS, leva à acumulação de ROS e à peroxidação de lípidos (LPO), podendo em última análise levar à morte da célula (Fernández-Blanco *et al.*, 2014).

Por outro lado, os produtos alimentares que contenham polifenóis (especialmente o azeite virgem extra) podem contribuir para a diminuição do risco de ROS na dieta mediterrânea. O azeite virgem extra é uma fonte de compostos fenólicos, como hidroxitirosol, tirosol, oleuropeo, e neste caso foi demonstrado que o extrato deste azeite protege a linha celular epitelial de células Caco-2 da citotoxicidade induzida pelas ROS. Assim, é possível contribuir para a diminuição do risco toxicológico que contaminantes naturais da dieta, como as micotoxinas, podem produzir nos seres humanos (Chiesi *et al.*, 2015).

Caraterísticas físico-químicas

O alternariol (CAS – 641 – 38 – 3) com fórmula química $C_{14}H_{10}O_5$ e peso molecular de 258,23 g/mol, origina também 4 metabolitos, nomeadamente o 8-hidroxi-AOH; 4-hidroxi-AOH; 10-hidroxi-AOH e 2-hidroxi-AOH (Schuchardt *et al.*, 2014).

É um composto sólido à temperatura ambiente e com densidade $1,56 \text{ g/cm}^3$ e relativamente ao caráter ácido-base do alternariol, foi verificado que o valor de pK foi de 7,16. Pode ser dissolvido em DMSO (~30 mg/mL), etanol (~0,5 mg/mL), água (parcialmente), acetona (2,20-2,80 mg/mL) e DMF (~30 mg/mL), tendo um ponto de fusão e de ebulição de $205,88 \text{ }^\circ\text{C}$ e $586,89 \text{ }^\circ\text{C}$ (760 mmHg) respetivamente.

Toxicocinética

O alternariol demonstrou uma resposta tóxica no ratinho de $LD_{50} 400 \text{ mg/Kg}$, não sendo por isso considerada como muito aguda (Fernández-Cruz *et al.*, 2010). No entanto foi encontrado em dados obtidos a partir da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, 2011) em elevadas concentrações em grupos alimentares, como os legumes (Frizzell

et al., 2013). Foi ainda detetado em elevados níveis em cereais, nomeadamente na Austrália (10-1050 µg/Kg), na República Checa (6,3-44,4 µg/Kg), na Suécia (9-335 µg/Kg) e na China (106-731 µg/Kg) (Bensassi et al., 2012).

Também foi verificado que uma estimativa indicativa da exposição crónica na alimentação foi de 1,9-39 ng/Kg de peso corporal por dia, excede o valor limite de interesse toxicológico de 2,5 ng/Kg de peso corporal por dia, desenvolvido pela EFSA (Frizzell et al., 2013)

Em suma, são estas as preocupações relativas à saúde pública e à necessidade de dados toxicológicos adicionais, pois não existe regulação, nem na União Europeia nem em outros países, para o grupo de micotoxinas de *Alternaria* (Fernández-Cruz et al., 2010).

Absorção e Metabolização

Existem informações que demonstram que o AOH é rapidamente absorvido a nível do sistema gastrointestinal e sob a forma de aglicona (Fernández-Blanco, Font & Ruiz, 2015).

Após esta absorção, o AOH sofre extenso metabolismo de primeira passagem, a nível hepático, e é eliminado rapidamente por via fecal (Schuchardt et al., 2014). Este metabolismo oxidativo é mediado por citocromo (Fernández-Blanco et al., 2015).

A restante parte absorvida pela intestino é rapidamente metabolizada, com formação de catecóis e hidroquinonas, bem como conjugados de glucoronidos e sulfatos (Schuchardt et al., 2014).

Distribuição e Excreção

Após forte metabolismo de primeira passagem, a nível hepático, o AOH e os seus conjugados, através da bilis, podem chegar ao duodeno e após isso, serem distribuídos pela corrente sanguínea para qualquer parte do organismo (Fernández-Blanco et al., 2015).

Como já referido, devido a este efeito de primeira passagem, a excreção é efetuada maioritariamente por via fecal, sendo a restante eliminada pela urina (Schuchardt et al., 2014).

Incidência

O alternariol apresenta uma incidência natural, a qual ocorre espontaneamente nos alimentos, e uma incidência que ocorre mesmo após a utilização de vários processos (transporte, armazenamento, outros).

As toxinas de *Alternaria* podem permanecer estáveis durante o processamento de produtos alimentares humanos e animais, bem como aumentar a sua concentração sob condições favoráveis (Frizzell *et al.*, 2013).

Assim, os parâmetros importantes para o desenvolvimento desta micotoxina são a temperatura, humidade, pH e atividade da água (a_w). À temperatura e humidade são aliados no crescimento dos fungos, sendo que temperaturas quentes e ambientes húmidos são propícios ao seu desenvolvimento. No caso do pH e da atividade da água, sabe-se que nas frutas os valores de pH variam entre 2,5 a 5 e estes são toleráveis para a maioria das espécies de fungos, no entanto quanto à atividade da água utilizada pelos microorganismos, geralmente, o valor ótimo de a_w para o crescimento fúngico difere do valor ótimo de a_w para o qual é observado o nível máximo da formação de micotoxinas (Fernández-Cruz *et al.*, 2010).

A a_w mínima para a germinação de conídios de *A. alternata* é de 0,85, no entanto a a_w limitante para a deteção da produção de micotoxinas é ligeiramente maior do que para o crescimento, com uma ocorrência de produção ótima acima dos 0,95 a_w (Fernández-Cruz *et al.*, 2010).

Após reunidas as condições para a produção do AOH, torna-se relevante avaliar a incidência deste metabolito, principalmente nos vegetais e frutas, pois são conhecidos como matérias suscetíveis se serem contaminados com micotoxinas de *Alternaria*.

De acordo com dados da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, 2011), a incidência de AOH em produtos agrícolas e alimentação animal ($n = 300$), provenientes da Europa, era de 31% das amostras, num intervalo de concentrações de 6,3 a 1840 μg de AOH/Kg.

Dado que a alimentação em Espanha é baseada numa dieta mediterrânea, podemos inferir que a dose diária *per capita* do consumo de vegetais é de aproximadamente 424 g, e de maçã é de aproximadamente 66,3 g/pessoa (Fernández-Blanco *et al.*, 2014). Portanto, é relevante avaliar a incidência de AOH neste tipo de produtos.

Relativamente aos cereais, produto alimentar muito presente na dieta mediterrânea, podemos afirmar que a presença da micotoxina AOH é frequente, pelo que se torna importante avaliar a sua incidência neste produto alimentar.

De acordo com dados recolhidos de amostras do norte da Sérvia, região com enorme área de produção de trigo, a incidência de AOH ao longo dos anos tem-se alterado, nomeadamente em 2013, foi detetada incidência de 53,8 %, em 2012 de 7,7 % e em 2011 de 2,5%. Para o período em estudo (2011-2013) os valores médios das amostras positivas para o AOH não excederam os 18,6 µg/Kg (Vučković *et al.*, 2012).

Em suma, podemos concluir que os produtos contaminados com AOH são consumidos regularmente pela maioria da população a nível mundial, como se constata nas tabelas 1, 2 e 3.

Torna-se necessário avaliar a presença desta micotoxina nos produtos onde ocorre principalmente, como os cereais, tomate e derivados e frutas (Walravens *et al.*, 2014).

Tabela 1 - Ocorrência e níveis de Alternariol em cereais

Teores (µg/Kg)					
País	Cereal	Frequência	Min - Máx	Média	Bibliografia
<i>Estónia</i>	Aveia	0 / 2	-	-	Kütt <i>et al.</i> , 2010
	Trigo	3 / 4	210 - 340	260	
	Cevada	1 / 4	n.d - 130	-	
<i>Alemanha (2001–2010)</i>	Trigo	86 / 1064 (8,1%)	LOD - 831,7	77,44	Müller & Korn, 2013
<i>Sérvia</i>	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	11 / 92 (12%)	LOD - 48,9	12,2	Hajnal <i>et al.</i> , 2015
<i>Bélgica</i>	Arroz (comercializado)	6 / 31 (19%)	1,83 - 2,97	-	Walravens <i>et al.</i> , 2014

- dados não disponíveis

Tabela 2 - Ocorrência e níveis de *Alternariol* em produtos à base de cereais

Teores ($\mu\text{g/Kg}$)					
País	Produto	Frequência	Min – Máx	Média	Bibliografia
Canadá	Farinha e farelo	6 / 15	n. d - 63	-	Scott <i>et al.</i> , 2012
	Cereais peq. almoço	10 / 10	0,4 - 35	-	
	Pão	29 / 29	0,4 - 6,7	-	
	Alimentos infantis	25 / 29	n. d - 4,4	-	
Alemanha	Farinha de espelta (Triticum spelta)	1 / 13	n. d - 4,1	-	Asam <i>et al.</i> , 2011
Camarões	Cerveja de milho	3 / 12	0,05 - 0,6	0,3	Abia <i>et al.</i> , 2013

- dados não disponíveis

Tabela 3 - Ocorrência e níveis de *Alternariol* em frutos e derivados

Teores ($\mu\text{g/Kg}$)					
País	Produto	Frequência	Min – Máx	Média	Bibliografia
Alemanha	À base de tomate	5 / 10	2,6 - 2,5	-	Asam <i>et al.</i> , 2011
	Vinho	4 / 6	1,2 - 4,9		
Espanha	Sumo concentrado de maçã	17 / 32	1,35 - 5,42 ($\mu\text{g/L}$)	-	Delgado & Gómez-Cordovés, 1998
Itália	À base de tomate	5 / 10	4,0 - 6,8	-	Prelle <i>et al.</i> , 2013

- dados não disponíveis

Metodologias Analíticas

Os procedimentos analíticos a utilizar na extração, na purificação e na deteção e quantificação variam de acordo com o tipo de amostra, com as propriedades intrínsecas do alimento, com as propriedades do analito em pesquisa e do tipo de resultado pretendido. Para além deste processo, a validação dos métodos utilizados tem um papel fundamental.

Neste caso, as metodologias analíticas mais utilizadas na deteção e quantificação de AOH em cereais, produtos à base de cereais e frutos e derivados encontram-se esquematizadas nas tabelas 4, 5 e 6, respetivamente.

No que respeita aos processos de extração, têm sido utilizados acetoneitrilo em mistura com outros solventes, designadamente metanol (Scott *et al.*, 2012), água (Asam *et al.*, 2011; Delgado & Gómez-Cordovés, 1998). O metanol também tem sido utilizado isoladamente em produtos à base de tomate (Asam *et al.*, 2011; Prella *et al.*, 2013). O acetato de etilo em mistura com ácido clorídrico e água foi usado no caso do trigo (Janić Hajnal *et al.*, 2015).

Quanto à purificação, alguns investigadores recorreram à centrifugação seguida de filtração (Walravens *et al.*, 2014), outros optaram pela extração em fase sólida com colunas C18 (Asam *et al.*, 2011; Delgado *et al.*, 1998) e alguns utilizaram colunas C18 e aminopropil (Scott *et al.*, 2012).

Relativamente à deteção e quantificação, a instrumentação analítica mais comumente utilizada tem sido a cromatografia líquida (LC) acoplada ao detetor de massa em tandem (MS/MS) (Abia *et al.*, 2013; Asam *et al.*, 2011; Janić Hajnal *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2012). Alguns outros investigadores recorreram à UPLC – MS/MS (Walravens *et al.*, 2014).

Para a maioria dos investigadores o método analítico de eleição, da deteção e quantificação do AOH é o HPLC – MS/MS e melhor ainda, o UPLC – MS/MS.

Tabela 4 - Metodologias analíticas na detecção e quantificação de alternariol em cereais

Cereal	Extração	Purificação	Deteção e Quantificação	Bibliografia
<i>Aveia</i> <i>Trigo</i> <i>Cevada</i> (8g)	1º: ACN + KCl 4% em H ₂ O (9 : 1, v/v, 40 mL) 2º: Clorofórmio	Acetato de chumbo (0,05 M) Filtração	HPLC – DAD: Eluição por gradiente (HPLC) A: metanol + ACN + ZnSO ₄ •H ₂ O 300 mg/L (60 : 4 : 36, v/v) B: (75 : 15 : 10, v/v)	Kütt et al., 2010
<i>Trigo</i> (<i>Triticum aestivum</i>)	1º: ACN + KCl 4% 2º: DCM	Acetato de chumbo (0,05 M) Filtração	HPLC – DAD HPLC – MS/MS Coluna fase reversa em HPLC Eluição: metanol + H ₂ O (75 : 25, v/v) ZnSO ₄ •H ₂ O 300 mg/L	Müller & Korn, 2013
<i>Trigo</i> (<i>Triticum aestivum</i>) (1g)	EtOAc + HCl + H ₂ O (5 mL/ 2 mL/ 7 mL)	Centrifugação a 5000 rpm, 15 minutos	LC – ESI MS/MS Eluição: A: ácido fórmico aquoso 0,05% B: metanol	Hajnal et al., 2015
<i>Arroz</i> <i>comercializa</i> <i>do</i> (2,5g)	ACN/H ₂ O/CH ₃ C OOH (79/ 19,5/ 1,5 mL v/v/v)	Centrifugação a 3000g, 12 minutos	UPLC – ESI – MS/MS Eluição por gradiente (UPLC): A + B (70/30, v/v) A: água ultra pura/ CH ₃ COOH (99 : 1, v/v) B: ACN/ CH ₃ COOH (99 : 1, v/v)	Walravens et al., 2014

Tabela 5 - Metodologias analíticas na detecção e quantificação de alternariol em produtos à base de cereais

Cereal	Extração	Purificação	Deteção e Quantificação	Bibliografia
Farinha e farelo Cereais peq. almoço Pão Alimentos infantis (2,5g)	25 mL Metanol ACN (50%)	SPE : C18 / aminopropil Eluição: ACN - CH ₃ COOH (100 : 1, v/v)	LC – MS/MS	Scott <i>et al.</i> , 2012
Farinha de espelta (Triticum spelta) (1g)	ACN/H ₂ O (84/16, v/v)	SPE : C18 Eluição: 5 mL metanol	LC – MS/MS	Asam <i>et al.</i> , 2011
Cerveja de milho (50 mL)	ACN/ H ₂ O/ác. Acético glacial (79 : 20 : 1, v/v/v)	Centrifugação a 10 000 rpm, 3 minutos	LC – ESI – MS/MS Eluição A: MeOH/ H ₂ O/ ác. acético glacial (10 : 89 : 1, v/v/v) B: (97 : 2 : 1, v/v/v)	Abia <i>et al.</i> , 2013

Tabela 6 - Metodologias analíticas na detecção e quantificação de alternariol em frutos e derivados

Produto	Extração	Purificação	Deteção e Quantificação	Bibliografia
À base de tomate (5g) Vinho (10g)	Metanol	SPE : C18	HPLC – MS/MS	Asam <i>et al.</i> , 2011
Sumo de maçã concentrado (10 mL)	ACN/H ₂ O (1:3, v/v)	SPE : C18 Eluição: 4 mL ác. acético 1% em ACN SPE : aminopropil Eluição: 5 mL de ác. fórmico a 1% em ACN	HPLC – DAD	Delgado <i>et al.</i> , 1998
À base de tomate (30 mL)	Metanol	SPE : StrataX Eluição: H ₂ O:MeOH, 50:50)	LC – APCI – MS	Prelle <i>et al.</i> , 2013

Estratégias de diminuição de micotoxinas em alimentos

Como podemos verificar, as micotoxinas estão presentes em variados e inúmeros produtos alimentares de consumo humano e animal, em vários continentes.

De modo que, num âmbito diferente dos controlos regulamentares, torna-se necessário adotar medida estratégicas para diminuir ou eliminar a presença das micotoxinas na alimentação. Assim, as três estratégias principais são: a prevenção da contaminação de micotoxinas durante o período pré-colheita e pós-colheita, a destoxificação das micotoxinas presentes nos alimentos e a inibição da absorção das micotoxinas no trato gastro-intestinal (Fernández-Cruz *et al.*, 2010).

A principal estratégia passa pela prevenção, que tem como principal objetivo a inibição da formação das micotoxinas, passando por uma boa gestão agrícola, utilização de inseticidas, fungicidas e de controlo biológico, irrigação e cultivar uma seleção de vegetais menos vulneráveis ao *stress*. A contaminação pós-colheita pode ser evitada através do controlo da humidade, da temperatura e microbiológico (Fernández-Cruz *et al.*, 2010).

A destoxificação pelos diferentes métodos, físicos, químicos e biológicos, são menos efetivos e, por vezes, restritos, com possível diminuição da qualidade nutricional e implicações de custos (Fernández-Cruz *et al.*, 2010).

Por último, algumas das intervenções estudadas mais promissoras envolve o uso de microorganismos para reduzir a absorção de micotoxinas ingeridos nos alimentos, no trato gastro-intestinal. Experimentalmente há evidências claras da capacidade de bactérias probióticas diminuir o potencial bioativo de determinadas micotoxinas em humanos, mas são necessários mais estudos (Fernández-Cruz *et al.*, 2010).

Conclusão

A exposição a micotoxinas apresenta um grave risco para a saúde humana, nomeadamente pela sua incidência. De salientar, o particular interesse nos países em vias de desenvolvimento, nos quais as práticas de agricultura moderna estão menos desenvolvidas bem como a legislação do processamento dos alimentos.

Assim, é necessário uma continuação da investigação da toxicidade desta micotoxina e das restantes, produzidas pelo género *Alternaria*.

Novas investigações serão realizadas, a fim de se avaliar o potencial toxicológico da *Alternaria* e conseqüentemente a validação de novos métodos analíticos.

De salientar, que a aposta no controlo e prevenção é a melhor estratégia para evitar a exposição do consumidor.

Bibliografia

- ABIA, W. A., WARTH, B., SULYOK, M., KRŠKA, R., TCHANA, A. N., NJOBEH, P. B., DUTTON, M. F. & MOUNDIPA, P. F. - **Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).** *Food Control* 31 (2013), 438-453.
- ASAM, S., KONITZER, K. & RYCHLIK, M. - **Precise determination of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in cereal, fruit and vegetable products using stable isotope dilution assays.** *Mycotoxin Res* 27 (2011), 23-8.
- BENSASSI, F., GALLERNE, C., SHARAF EL DEIN, O., HAJLAOUI, M. R., BACHA, H. & LEMAIRE, C. - **Cell death induced by the *Alternaria* mycotoxin Alternariol.** *Toxicol In Vitro* 26 (2012), 915-23.
- Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. **PubChem Composto Banco de dados; CID= 5359485**, (acedido em 02 de Setembro de 2015). Disponível na Internet em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5359485>
- CHIESI, C., FERNANDEZ-BLANCO, C., COSSIGNANI, L., FONT, G. & RUIZ, M. J. - **Alternariol-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oil.** *Toxicon* 93 (2015), 103-111.
- DELGADO, T. & GÓMEZ-CORDOVÉS, C. - **Natural occurrence of alternariol and alternariol methyl ether in Spanish apple juice concentrates.** *J Chromatogr A* 815 (1998), 93-7.
- FERNÁNDEZ-BLANCO, C., FONT, G. & RUIZ, M. J. - **Oxidative stress of alternariol in Caco-2 cells.** *Toxicol Lett* 229 (2014), 458-64.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) - **Panel on Contaminants in the FoodChain, Scientific opinion on the risks for animals and public health**

related to the presence of **Alternaria** toxins in feed and food **EFSA**, 9 (2011), p. 2407

FERNÁNDEZ-BLANCO, C., FONT, G. & RUIZ, M. J. - **Oxidative DNA damage and disturbance of antioxidant capacity by alternariol in Caco-2 cells.** *Toxicol Lett* 235 (2015), 61-6.

FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L., MANSILLA, M. L. & TADEO, J. L. - **Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications.** *Journal of Advanced Research I* (2010), 113-122.

FRIZZELL C., NDOSSI, D., KALAYOU, S., ERIKSEN, G. S., VERHAEGEN, S., SØRLIE, M., ELLIOTT, C. T., ROPSTAD, E. & CONNOLLY, L. - **An in vitro investigation of endocrine disrupting effects of the mycotoxin alternariol.** *Toxicol Appl Pharmacol* 271 (2013), 64-71.

JANIĆ HAJNAL, E., ORČIĆ, D., TORBICA, A., KOS, J., MASTILOVIĆ, J. & ŠKRINJAR, M. (2015). **Alternaria** toxins in wheat from the **Autonomous Province of Vojvodina, Serbia: a preliminary survey.** *Food Additives & Contaminants: Part A* 32 (2015), 361-370.

KÜTT, M-L., LÖIVEKE H. and TANNER R. - **Detection of alternariol in Estonian grain samples.** *Agronomy Research* 8 (Special Issue II) (2010), 317-322.

LEHMANN L., WAGNER, J. & METZLER, M. - **Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells.** *Food Chem Toxicol* 44 (2006), 398-408.

MÜLLER, M. E. H. & KORN, U. - **Alternaria** mycotoxins in wheat – **A 10 years survey in the Northeast of Germany.** *Food Control* 34 (2013), 191-197.

PAVÓN, M. A., GONZÁLEZ, I., MARTIN R. and GARCIA T. **Chapter II Alternaria spp and mycotoxins.** In: R. Russell, M. Paterson & N. Lima. *Molecular Biology of Food and Water Borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi.* CRC Press Taylor & Francis Group. in 2016. p. 139-150

- PRELLE A., SPADARO, D., GARIBALDI, A. & GULLINO, M. L. - **A new method for detection of five alternaria toxins in food matrices based on LC-APCI-MS.** *Food Chem* 140 (2013), 161-7.
- Santa Cruz Biotechnology. **Product Block, Alternariol: sc-202923** (acedido em 3 de Setembro de 2015). Disponível na Internet em: <http://www.scbt.com/pt/datasheet-202923-Alternariol.html>
- SCOTT, P. M., ZHAO, W., FENG, S. & LAU, B. P. - **Alternaria toxins alternariol and alternariol monomethyl ether in grain foods in Canada.** *Mycotoxin Res* 28 (2012), 261-6.
- SOLHAUG, A., VINES, L. L., IVANOVA, L., SPILSBERG, B., HOLME, J. A., PESTKA, J., COLLINS, A. & ERIKSEN, G. S. - **Mechanisms involved in alternariol-induced cell cycle arrest.** *Mutat Res* 738-739 (2012), 1-11.
- VUČKOVIĆ, J. N., BRKLJAČA, J. S., BODROŽA-SOLAROV, M. I., BAGI, F. F., STOJŠIN, V. B., ČULAFIĆ, J. N., & AĆIMOVIĆ, M. G. - **Alternaria spp. on small grains.** *Food and Feed Research (Serbia)*, 39 (2) (2012), 79-88.
- WALRAVENS, J., MIKULA, H., RYCHLIK, M., ASAM, S., EDIAGE, E. N., DI MAVUNGU, J. D., VAN LANDSCHOOT, A., VANHAECKE, L. & DE SAEGER, S. - **Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated Alternaria toxins in cereal-based foodstuffs.** *J Chromatogr A* 1372C (2014), 91-101.