

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Eloiza Rodrigues Pimentel de Sá

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR OCRATOXINA A E AFLATOXINAS EM  
AMOSTRAS DE PIMENTA DO REINO COMERCIALIZADAS NO ESTADO DO RIO  
DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2017

Eloiza Rodrigues Pimentel de Sá

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR OCRATOXINA A E AFLATOXINAS EM  
AMOSTRAS DE PIMENTA DO REINO COMERCIALIZADAS NO ESTADO DO RIO  
DE JANEIRO**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Tutor: Armi Wanderley da Nobrega

Preceptora: Maria Heloisa Paulino de Moraes

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Sá, Eloiza Rodrigues Pimentel de

Avaliação da contaminação por ocratoxina a e aflatoxinas em amostras de pimenta do reino comercializadas no estado do Rio de Janeiro. / Eloiza Rodrigues Pimentel de Sá – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2017.

51 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Preceptora: Maria Heloisa Paulino de Moraes

Tutor: Armi Wanderley da Nobrega

1. Pimenta. 2. Piper nigrum. 3. Contaminação de Alimentos. 4. Ocratoxinas. 5. Aflatoxinas. I. Título

Eloiza Rodrigues Pimentel de Sá

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR OCRATOXINA A E AFLATOXINAS EM  
AMOSTRAS DE PIMENTA DO REINO COMERCIALIZADAS NO ESTADO DO RIO  
DE JANEIRO**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovada em 09 / 02 / 2017

Banca Examinadora

---

Silvana do Couto Jacob (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Lucia Helena Pinto Bastos (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Maria Heloisa Paulino de Moraes (Mestre) - Preceptora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Armi Wanderley da Nobrega (Doutor) - Tutor  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pelo seu amparo e presença em todos os momentos da minha vida;

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional, por sempre me ajudarem e não me deixarem fraquejar nas horas mais difíceis. Agradeço a vocês por tudo que fizeram por mim. Amo vocês;

Ao Vinícius, meu marido, por todo amor, carinho, companheirismo, compreensão e paciência;

Ao Bob, meu companheiro fiel, que esteve sempre ao meu lado durante toda a confecção deste trabalho;

A minha orientadora, Maria Heloisa P. de Moraes pela sua paciência e orientação;

Aos meus amigos do laboratório de micotoxinas, André Sartori, Rosana Santos e Nínive Alves, que foram fundamentais para o meu aprendizado durante o curso da residência.

## RESUMO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é a especiaria mais consumida no mundo. Os maiores produtores são Índia, Vietnã, Indonésia, Malásia e Brasil. Conhecida popularmente como um condimento, a pimenta do reino é utilizada para acrescentar sabor aos alimentos, e, secundariamente, possui propriedades antioxidantes. Contudo, a pimenta do reino, frequentemente, tem apresentado contaminação por fungos durante o processo de secagem e armazenamento dos grãos. Esses fungos podem produzir metabólitos secundários, as micotoxinas, que compreendem um conjunto complexo de substâncias tóxicas capazes de induzir doenças agudas e crônicas em seres humanos e animais que tenham ingerido alimentos contaminados. Dentre as micotoxinas existentes, duas delas são encontradas na pimenta do reino: Aflatoxinas B1, B2, G1, G2, e Ocratoxina A. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar uma metodologia para determinação, quantificação e avaliação da contaminação de Aflatoxinas em pimenta do reino. O método analítico utilizado baseia-se na extração de micotoxinas utilizando coluna de imunoafinidade e para a determinação utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/F) em fase reversa. Foram avaliados os seguintes parâmetros do método na validação: seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão e recuperação. O resultado deste estudo mostrou que o método analítico validado é eficaz para a obtenção da concentração de aflatoxinas em amostras de pimenta do reino analisadas. Das 18 amostras analisadas 7 apresentaram contaminação por aflatoxinas, com nível entre 0,38 e 2,24 µg/kg. Com isso, espera-se que medidas mais rigorosas de prevenção e controle sejam providenciadas pela vigilância sanitária a fim de diminuir o risco de exposição a estas micotoxinas, e conseqüentemente, diminuir os riscos à saúde do consumidor.

Palavras-Chave: pimenta do reino, micotoxinas, contaminação.

## ABSTRACT

Black pepper (*Piper nigrum* L.) is the most consumed spice in the world. The largest producers are India, Vietnam, Indonesia, Malaysia and Brazil. Popularly known as a condiment, the black pepper is used to increase and / or add flavor to food; secondarily, has conservation purpose, due to its antioxidant properties. However, black pepper has frequently been contaminated by fungi during the drying and storage of the grains. These fungi may produce secondary metabolites, mycotoxins, which comprise a complex set of toxic substances capable of inducing acute and chronic diseases in humans and animals that have ingested contaminated food. Among the existing mycotoxins, aflatoxins B1, B2, G1, G2, and Ochratoxin A are able to contaminate black pepper. The objective this study was develop and validate a method for the determination, quantification and evaluation of aflatoxin contamination and in black pepper. The method is based on extraction of the mycotoxins using immunoaffinity column and for the determination and quantification was used the high-performance liquid chromatography with reverse phase fluorescence detector (HPLC/F). The following validation method parameters were evaluated: selectivity, linearity, sensitivity, precision and recovery. The results of this study showed that the validated analytical method is effective to obtain the aflatoxin concentration in the analyzed pepper samples. Of the 18 samples analyzed, 7 presented aflatoxin contamination, with a level between 0.38 and 2.24  $\mu\text{g} / \text{kg}$ . It is expected that more stringent prevention and control measures will be provided by health surveillance in order to reduce the risk of exposure to these mycotoxins and consequently reduce the risks to consumer health.

Key words: black pepper, mycotoxins, contamination.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: ocorrência da contaminação de pimenta do reino por aflatoxinas e ocratoxina A em diversos países.....	18
Tabela 2: limites máximos toleráveis para ocratoxina A e aflatoxinas em pimenta do reino, em diferentes países. ....	19
Tabela 3: número de amostras e o tipo de produção. ....	23
Tabela 4: métodos utilizados para propor a validação das aflatoxinas e suas respectivas referências. ....	29
Tabela 5: LQ e LD do método estudado para as aflatoxinas.....	30
Tabela 6: estatística das curvas analíticas utilizadas na validação das amostras de pimenta do reino na determinação das aflatoxinas. ....	30
Tabela 7: resultados das amostras de pimenta fortificadas com aflatoxinas B1. ....	32
Tabela 8: precisão Intermediária da metodologia proposta para aflatoxina B1, LOQ (n=2; alíquota independente) .....	32
Tabela 9: precisão Intermediária do método proposto para a aflatoxina B1, avaliada na concentração de AFB1= 2,35 µg/Kg. ....	33
Tabela 10: resultados das amostras de pimenta fortificadas com aflatoxinas B2. ....	33
Tabela 11: precisão Intermediária da metodologia proposta para aflatoxina B2, LOQ (n=2; alíquota independente) .....	33
Tabela 12: precisão Intermediária da metodologia proposta para aflatoxina B2, avaliada na concentração de B2= 2,731 µg/kg .....	34
Tabela 13: resultados das amostras de pimenta fortificadas com aflatoxinas G1. ....	34
Tabela 14: precisão Intermediária da metodologia proposta para aflatoxina G1, no LOQ, 0,79 e 6,19 µg/kg. ....	35
Tabela 15: resultados das amostras de pimenta fortificadas com aflatoxinas G2. ....	36
Tabela 16: precisão Intermediária da metodologia proposta para aflatoxina G2, LOQ (n=2; alíquota independente) .....	36
Tabela 17: precisão Intermediária da metodologia proposta para aflatoxina G2, avaliada na concentração de G2= 2,055 µg/kg. ....	36
Tabela 18: resultado da determinação de Afs em amostras de pimenta do reino analisadas. ....	38
Tabela 19: comparação dos níveis de contaminação por AF E OTA em pimenta do reino entre alguns dos principais países produtores. ....	43

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: estrutura química da Ocratoxina A. ....	15
Figura 2: estrutura química das aflatoxinas. ....	16
Figura 3 adaptada: mecanismo de funcionamento da coluna de imunoafinidade. ....	24
Figura 4: fluxograma do método para análise de Aflatoxinas. ....	26
Figura 5: fluxograma do método para análise de Ocratoxina. ....	27
Figura 6: cromatograma da amostra de pimenta do reino naturalmente contaminada por aflatoxinas. ....	38
Figura 7: cromatograma do padrão de aflatoxinas. ....	39
Figura 8: cromatograma da amostra de pimenta reino não contaminada. ....	39

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ng- nanograma

µg- micrograma

µL- microlitros

g- grama

kg- quilograma

° C- graus Celsius

mL- mililitros

min- minutos

AF- aflatoxinas

AFB1- aflatoxina B1

AFB2- aflatoxina B2

AFG1- aflatoxina G1

AFG2- aflatoxina G2

AOAC- Association of Official Analytical Chemists

ANVISA- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

APPCC- Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento

CLAE/F- Cromatografia líquida de alta eficiência

CIA- Coluna de Imunoafinidade

RSD<sub>r</sub>- Desvio Padrão Relativo

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMBRAPA- Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IARC- International Agency for Research on Cancer

INCQS- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO- Instituto Nacional De Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LMT- Limite Máximo Tolerável

LQ – Limite de quantificação

LD- Limite de detecção

P.A.- Para Análise

POP- Procedimento Operacional Padrão

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 PIMENTA DO REINO.....	12
1.2 OCRATOXINA A .....	14
1.3 AFLATOXINAS .....	15
1.4 CONTAMINAÇÃO DE PIMENTA DO REINO POR MICOTOXINAS.....	16
1.5 LEGISLAÇÃO .....	18
1.6 PREVENÇÃO E CONTROLE .....	19
1.7 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MICOTOXINAS .....	20
1.8 JUSTIFICATIVA .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 Geral .....	21
2.2 Específicos.....	21
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>22</b>
3.1 AMOSTRAGEM .....	22
3.2 EQUIPAMENTOS .....	23
3.3 PADRÕES E REAGENTES .....	24
3.4 VIDRARIAS.....	25
3.5 PREPARO DA AMOSTRA .....	25
3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>28</b>
4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	28
4.1.1 Resumo da Validação para Aflatoxinas .....	30
4.1.2 Resumo da Validação do método para aflatoxina B1 .....	32
4.1.3 Resumo da Validação do método para aflatoxina B2.....	33
4.1.4 Resumo da Validação do método para aflatoxina G1.....	34
4.1.5 Resumo da Validação do método para aflatoxina G2.....	35
4.2 RESULTADO ENCONTRADO NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM PIMENTA DO REINO .....	37
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 PIMENTA DO REINO

A pimenta do reino (*Piper nigrum* L.) popularmente conhecida como pimenta preta é a especiaria mais consumida no mundo, é classificada como condimento, substância utilizada para aprimorar o sabor dos alimentos. É uma espécie do tipo trepadeira arbustífera, pertencente à família *Piperaceae*, originária das regiões tropicais da Índia, e introduzida no Brasil durante o período da colonização pelos escravos (EMBRAPA, 2006; PISSINATE, 2006).

A *Piper nigrum* L. é considerada como a única especiaria cujos frutos podem ser comercializados em 4 diferentes tipos que correspondem ao estado de maturação. As pimentas branca, verde e preta são os principais tipos de pimenta do reino existentes nos supermercados. Todos esses grãos de pimenta são procedentes da mesma espécie *P. nigrum*, porém distintos segundo período de colheita e beneficiamento empregado. A pimenta do reino branca é colhida após a maturação completa das sementes, quando a casca já está vermelha e para se tornarem brancas passam por um tipo de processamento trabalhoso, no qual são ensacadas e armazenadas submersas em água potável e corrente durante 15 a 30 dias, até adquirirem essa coloração, e depois secagem dos grãos ao sol. A pimenta preta é colhida com o fruto semimaduro, quando a casca começa amarelar, e seu preparo envolve secagem em forno ou ao sol, até adquirir a cor e aspecto característicos. A pimenta verde é colhida na forma imatura, e os grãos são mantidos na forma natural sem sofrer processamento, e comercializados em salmouras. E por último, a pimenta vermelha, é colhida em estágio de maturação total e devido à sua coloração avermelhada, o fruto é muitas vezes confundido com a semente de aroeira. Para comercialização sofre processo de secagem e desidratação (EMBRAPA, 2004; CARNEVALLIA; ARAÚJO, 2013).

A pimenta do reino possui em sua composição química um excelente padrão nutricional, por se tratar de uma planta rica em vitaminas A, C, E, e em minerais como cálcio e ferro, entre outros compostos importantes para o bom funcionamento e desenvolvimento do organismo (BOMTEMPO, 2007).

Além disso, a pimenta figura como um importante recurso medicinal para a população, além de estar presente em todos os tipos de culinária (BOMTEMPO, 2007). Utilizadas há séculos por diferentes populações como a Chinesa, Indiana e Norte Africana, a pimenta do reino possui ação antiinflamatória e antioxidante devido à presença de flavonóides e terpenos em sua composição. A piperina é o alcalóide majoritário da planta, e exerce efeito terapêutico, podendo promover ação efetiva sobre o sistema imunológico, como no caso de doenças que levam a imunossupressão, como a quimioterapia e radioterapia no tratamento de câncer (PISSINATE, 2006). Diversos autores como Cardoso et al. (2005), Bomtempo (2007), Ee et al., (2010), Abbasi et al. (2010) e Khan et al. (2010) afirmaram que a piperina possui reconhecida atividade citotóxica, anti-inflamatória, antipirética, analgésica, antioxidante, antitumoral, antifúngica e bactericida.

Segundo estudos de CHAUDHRY; TARIQ (2006), o extrato da *Piper nigrum* L., pode ainda se tornar uma importante plataforma para o desenvolvimento, seguro, eficaz e de baixo custo de medicamentos naturais, no controle de bactérias resistentes que estão se tornando uma ameaça à saúde humana.

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2016), a pimenta do reino é cultivada em mais de 100 municípios dos Estados do Pará, além dos Estados do Espírito Santo, Bahia, Maranhão, Ceará, Paraíba e Amapá. O Estado do Pará é responsável por mais de 80% da produção do país, a produtividade média é de aproximadamente 2 a 5 toneladas de grãos por hectare, o qual corresponde, a 28% da produção mundial, sendo a maior parte da produção destinada à exportação. Esses dados inserem o país entre os maiores produtores de pimenta do reino, oscilando entre a terceira e quarta posição no mercado mundial. Além disso, apresenta grande importância socioeconômica, como geradora de renda para famílias rurais (LOURINHO et al., 2014, CONAB, 2015). No cenário mundial, atualmente, o principal produtor é o Vietnã, seguido de Índia, Indonésia, Brasil, Malásia, Tailândia, Sri Lanka, China e outros (CONAB, 2015).

No entanto, a pimenta do reino constantemente tem apresentado contaminação por fungos que se desenvolvem durante o processo de secagem e armazenamento. Esses fungos podem produzir metabólitos secundários, denominados micotoxinas, cujas características são bem definidas: amplo espectro

de toxicidade, baixo peso molecular, não imunogenicidade, termo-estáveis e atuam em baixas concentrações. As micotoxinas compreendem um conjunto complexo de substâncias tóxicas capazes de induzir doenças agudas e crônicas em seres humanos e animais que tenham ingerido alimentos contaminados. (CHU, 1991; MURPHY et al., 2006). Nem todos os fungos produzem toxinas, portanto a presença de fungos no alimento não implica que toxinas foram produzidas, por outro lado, a ausência de sinais visíveis de embolramento não significa que o alimento está livre de toxinas, uma vez que as mesmas podem persistir após o desaparecimento dos fungos (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010).

A exposição às micotoxinas pode produzir efeitos tóxicos, variando desde efeitos deletérios no sistema imunológico, nas funções hepáticas e renais, no sistema nervoso central, no trato digestivo, até a morte. Estas substâncias podem ainda ser carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras (CREPPY, 1999; ZAIN, 2011; MARIN et al., 2013). Estima-se que até 50% dos alimentos produzidos podem estar contaminados (MAGAN; OLSEN, 2004; FREIRE et al., 2007; VIDAL et al., 2013). Dentre os alimentos com maior ocorrência de micotoxinas destacam-se o milho, trigo, arroz, amendoim, café, frutas desidratadas farinha de mandioca, cerveja, especiarias, leite e seus derivados (HUSSEIN; BRASEL, 2001; ZAIN, 2011; DIDWANIA; BENKERROUM, 2016).

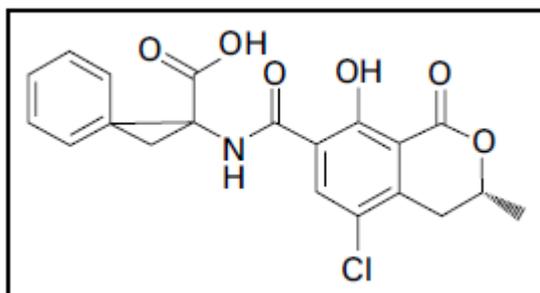
As micotoxinas são produzidas principalmente por cinco gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria*. As principais micotoxinas encontradas em alimentos são: aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1), ácido fusárico, fumonisinas (B1 e B2), ocratoxinas (A, B e C), patulina, citrinina, zearalenona e tricotecenos (CHARMLEY et al., 1994). Dentre as micotoxinas existentes, duas delas são encontradas na pimenta do reino: Aflatoxinas B1, B2, G1, G2, e Ocratoxina A.

## 1.2 OCRATOXINA A

A ocratoxina A (OTA) tem sido encontrada em diversos alimentos como aveia, cevada, centeio, trigo, grãos de café, especiarias e em outros produtos para consumo humano e animal, por isso, sua toxicidade e ocorrência tem despertado o interesse de muitos pesquisadores (DUARTE, 2010). Existem 3 tipos de ocratoxina: A, B e C, o que diferencia uma molécula da outra é a ligação com átomo de Cloro que está presente na ocratoxina A, tornando-a mais estável, e conferindo maior

importância toxicológica que as demais. Possui características de sensibilidade à luz, termo resistência, podendo suportar temperaturas até 200°C, e apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos polares e pouca solubilidade em solventes apolares (KÓSZEGI; POÓR, 2016). A figura 1 representa a estrutura da ocratoxina A.

Figura 1: estrutura química da Ocratoxina A.



Fonte: FREIRE et al., (2007).

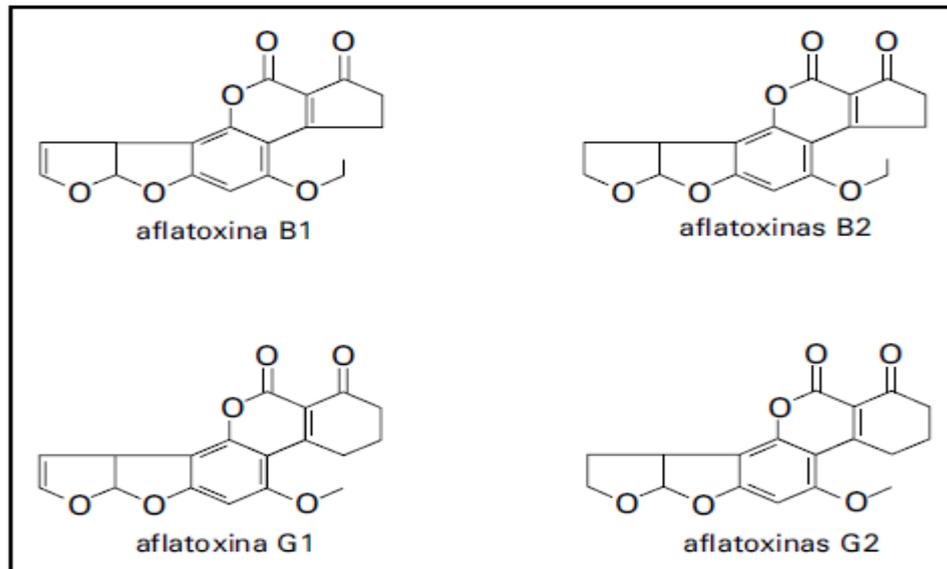
A OTA é produzida principalmente, pela contaminação de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). Os órgãos alvo da OTA são a princípio os rins, correspondendo, portanto, a uma nefrotoxina; e em segundo lugar o fígado (SCUSSEL, 1998). A inibição da síntese de proteínas é considerada o maior efeito tóxico da OTA, porém existe outros como a inibição da cadeia respiratória e alterações do DNA, por isso, essa micotoxina foi classificada pela IARC (International Agency for Research on Cancer) como um possível carcinógeno humano, grupo 2 (IARC, 1993). A Ocratoxina A está associada a nefropatias em todos os animais estudados até o momento. Além de ser reconhecidamente nefrotóxica, é também hepatóxica, imuno-supressora, teratogênica e cancerígena (CREPPY, 1999; HEUSSNER; BINGLE, 2015).

### 1.3 AFLATOXINAS

As aflatoxinas (AFs) são produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, sendo frequentemente encontradas em amendoim, cereais, milho, arroz, frutas desidratadas, especiarias e rações para animais. Há vários tipos de aflatoxinas, dentre elas, destacam-se quatro, B1, B2, G1, G2; sendo que sua biotransformação, em diversas espécies animais, resulta na produção de

M1 e M2 (principais contaminantes do leite bovino) (BENNETT; KLICH, 2003). A figura 2 apresenta a estrutura química das quatro principais aflatoxinas.

Figura 2: estrutura química das aflatoxinas.



Fonte: FREIRE et al., (2007).

As aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 possuem efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. A principal síndrome produzida é hepatotoxicidade, e menor incidência problemas renais. Os órgãos mais afetados são o fígado, os rins e o cérebro. Neste contexto, as mutações determinadas pelas aflatoxinas representam alterações genéticas permanentes nas células afetadas, o que possibilita a iniciação do processo de neoplasia (FERREIRA et al., 2006; ZAIN, 2011).

A aflatoxina B1 é o mais potente hepatocarcinógeno descrito em mamíferos e é classificada no Grupo 1 (carcinógeno ao homem) pela International Agency of Research on Cancer (IARC, 1993). Existem inúmeros estudos sobre a carcinogenicidade ao fígado da AFB1 em diferentes espécies animais, incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas. Nestes animais, a AFB1 induz à formação de carcinoma hepatocelular, mesmo quando ingerida em quantidades muito baixas, o que permite considerá-la como um dos mais potentes hepatocarcinógenos naturais (UYSAL et al., 2005; LOPES et al., 2005; GACEM; HADJKHELIL, 2016).

#### 1.4 CONTAMINAÇÃO DE PIMENTA DO REINO POR MICOTOXINAS

A pimenta do reino tem sido alvo de contaminação por micotoxinas, principalmente as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, e ocratoxina A.

O desenvolvimento de fungos é um dos problemas mais sérios responsáveis pelas perdas pós-colheita, associadas a condições ambientais que prevalecem nas regiões produtoras durante o ciclo produtivo (URBANO et al., 2001). Durante as fases de colheita e secagem, os grãos entram em contato prolongado com o solo favorecendo a colonização fúngica podendo ser a principal via de contaminação (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006).

Alguns tipos de fungos estão relacionados aos grãos durante o processo de secagem e armazenamento e podem, sob condições específicas gerar perdas na qualidade, produzindo características desagradáveis como odores e sabores alterados, além da produção de micotoxinas comprometendo a segurança do produto e a saúde do consumidor (VELMOUROUGANE, 2000)

Na pimenta do reino, as principais espécies de fungos produtores de micotoxinas são: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* para aflatoxinas e *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus alliaceus*, *Penicillium viridicatum* para ocratoxina A. (YOGENDRARAJAH et al., 2014)

Diversas pesquisas de países como a Turquia, Espanha, Marrocos têm comprovado a contaminação de pimenta do reino por micotoxinas. (SANTOS, 2010; ZINEDINE, 2006; OZBEY; KABAK, 2012). A tabela 1 demonstra a contaminação de pimenta do reino por ocratoxina A e aflatoxinas em alguns países e suas respectivas concentrações.

Tabela 1: ocorrência da contaminação de pimenta do reino por aflatoxinas e ocratoxina A em diversos países.

<b>País</b>	<b>N° amostras/positivas</b>	<b>Média de AF (µg/kg)</b>	<b>Média de OTA (µg/kg)</b>	<b>Referências</b>
<b>Hungria</b>	86/56	0,14-10	0,4-10	(FAZEKAS, 2005)
<b>Turquia</b>	84/36	0,3- 46,8	NA*	(COLAK, 2006)
<b>Marrocos</b>	15/13	0,09-0,30	NA*	(ZINEDINE, 2006)
<b>Irlanda</b>	30/4	0.42-3.24	NA*	(O'RIORDAN, 2008)
<b>Turquia</b>	23/11	0,13-0,46	0,87-3,48	(OZBEY, 2012)
<b>Polônia</b>	16/14	NA*	0,001-0,04	(WASKIEWICZ, et al., 2013)

\*NA= não analisada.

No Brasil, a escassez de dados de contaminação de pimenta do reino por micotoxinas, e a demanda do CODEX ALIMENTARIUS por dados, justificam o interesse do estudo do presente projeto.

### 1.5 LEGISLAÇÃO

Tendo em vista a incidência da contaminação de pimentas do reino por micotoxinas, diversos países já têm limites máximos estabelecidos para micotoxinas devido à toxicidade em produtos agrícolas e alimentos processados destinados ao consumo humano e animal. A elaboração dessas legislações é baseada em aspectos políticos e econômicos, sendo extremamente necessária para o controle da contaminação de micotoxinas em alimentos e para preservação da saúde do consumidor. (COMMISSION REGULATION, 2005). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu, em fevereiro de 2011, limites máximos toleráveis para a presença de micotoxinas em alimentos. Para aflatoxinas em pimentas o limite máximo tolerável é de 20 µg/kg e para ocratoxina o limite máximo

estabelecido é de 30 µg/kg (ANVISA, 2011). Na tabela 2 constam os limites máximos toleráveis (LMT) para OTA e AFs em alguns países:

Tabela 2: limites máximos toleráveis para ocratoxina A e aflatoxinas em pimenta do reino, em diferentes países.

<b>PAÍS</b>	<b>LMT PARA AFLATOXINAS (µg/kg)</b>	<b>LMT PARA OCRATOXINA A (µg/kg)</b>
BRASIL	20	30
COMUNIDADE EUROPÉIA	10	15
EUA	20	NP*
JAPÃO	10	NP*
CUBA	5	NP*

NP\*: Não preconizado.

## 1.6 PREVENÇÃO E CONTROLE

Para prevenir e minimizar o risco de contaminação e desenvolvimento de fungos toxigênicos e conseqüentemente a produção de micotoxinas tem sido recomendada a adoção de Boas Práticas Agrícolas, Boas Práticas de Fabricação e Boas Práticas de Higiene com base no programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (CHALFOUN; BATISTA, 2007)

A contaminação com fungos produtores de micotoxinas pode ser minimizada com técnicas adequadas de preparo, secagem, transporte e estocagem. Um método de controle em condições de armazenamento envolve a redução do teor de umidade dos grãos (<15%) para atingir uma atividade de água segura e assim, diminuir o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas (COSTA et al., 2005). Para isso, torna-se fundamental o incentivo às soluções tecnológicas e às ações que privilegiem a adoção de boas práticas agrícolas que atenda à qualidade do produto e à segurança da saúde humana.

Devido à alta toxicidade das micotoxinas, muitos métodos têm sido utilizados para reduzir ou eliminá-las de diferentes alimentos. Esses métodos são classificados como biológicos, químicos e físicos (JALILI et al., 2012). Segundo estudos de Dhanya et al., (2009) o tratamento com radiação ionizante foi o método físico mais eficaz para a preservação de alimentos e manutenção de qualidade e segurança das pimentas por um tempo mais prolongado. Jalili et. al, (2012) estudaram a utilização de raios gama em amostras de pimenta do reino preta e branca contaminadas por ocratoxina A e aflatoxinas e demonstraram uma redução dos níveis dessas micotoxinas em 55,2%, 50,6%, 39,2%, 47,7% e 42,9% para OTA, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, respectivamente. Além de diminuir a contaminação da pimenta do reino, a utilização da radiação promove o aumento do tempo de vida de prateleira do produto, pois elimina bactérias, insetos e outros microorganismos.

## 1.7 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MICOTOXINAS

Algumas metodologias são utilizadas para detecção e quantificação de micotoxinas em pimenta do reino. Dentre elas, predominam as técnicas de Cromatografia em Camada Fina, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência (CLAE/F), Cromatografia Líquida de ultra eficiência acoplada a detector de massas e o método de imunensaio ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (AOAC, 1995; TRUCKSESS et al., 2000; LARSEN et al., 2001; COLAK et al., 2006).

Atualmente a metodologia mais utilizada baseia-se na extração com solventes orgânicos, purificação da toxina com coluna de imunoafinidade e detecção e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (SHARMAN et al., 1992).

Para minimizar resultados falsos, é essencial que haja a confirmação química de micotoxinas detectadas em amostras. Ainda que os aspectos visíveis ou as propriedades cromatográficas sejam semelhantes, isoladamente não garante que o composto isolado do extrato seja quimicamente idêntico à referência (padrões). Entre as técnicas disponíveis destacam-se a espectrometria de massa de alta resolução, ressonância magnética nuclear, mudança de fase móvel, derivatização e co-cromatografia (JIAO et al., 1992; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1998).

## 1.8 JUSTIFICATIVA

A pimenta do reino é a especiaria mais consumida no mundo como condimento para aprimorar o sabor dos alimentos, entretanto, se estiver contaminada por Aflatoxinas e ou Ocratoxina podem causar intoxicações agudas e crônicas tanto no organismo humano quanto em animais, além de serem classificadas como carcinogênicas e provável carcinógeno em humanos, respectivamente. Considerando a importância comercial do produto em questão e a escassez de dados da contaminação por estas micotoxinas no Brasil, o presente estudo é de relevância para a saúde pública, estabelecendo um método analítico, ferramenta importante para avaliar a contaminação de pimenta do reino por estas micotoxinas, visando impulsionar maior fiscalização e controle pelas autoridades sanitárias do país.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Desenvolver e validar um método analítico para determinação e quantificação de Aflatoxinas em amostras pimenta do reino.

### 2.2 Específicos

- a) Detectar e quantificar as Aflatoxinas B1, B2, G1 E G2 nas amostras de pimenta do reino comercializadas no Estado do Rio de Janeiro;
- b) Comparar as médias de contaminação de Aflatoxinas neste trabalho com a média de estudos presente na literatura;
- c) Avaliar a relevância da contaminação encontrada nas amostras de pimenta do reino analisadas.

### 3. METODOLOGIA

Os métodos para determinação de Ocratoxina A e Aflatoxina B1, B2, G1, G2 foram obtidos com base na metodologia de OZBEY & KABAK (2012, com modificações). São dois métodos diferentes, um para OTA e outro para AF que apresentam semelhanças entre si. O método baseia-se na extração das micotoxinas em coluna de imunoafinidade e a técnica de determinação e quantificação utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/F) utilizando fase reversa. Os métodos foram validados intralaboratorialmente, segundo protocolo de validação de métodos de análise para micotoxinas em alimentos, (POP 65.3120.145) anexado ao manual da qualidade do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde (INCQS), e os parâmetros da validação estudados foram: seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão e recuperação. Para a quantificação das amostras foram utilizadas as áreas dos picos presentes no cromatograma de cada amostra, estas áreas são calculadas e transformadas em concentração, expressa em  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $\text{ng}/\text{g}$ ), por meio do programa Analyte para análise estatística dos dados obtidos

#### 3.1 AMOSTRAGEM

As amostras analisadas foram compradas em diferentes estabelecimentos de alimentos, como mercados (produto industrializado) e lojas de produtos naturais (produto a granel) instalados no Estado do Rio de Janeiro, no período de abril de 2016 a setembro de 2016. Ao total, foram coletadas 18 amostras de pimenta do reino, de 5 marcas (industrializadas) diferentes incluindo pimenta do reino preta, branca, em pó e em grão. A predominância da coleta de amostras do tipo preta é devido à alta incidência de contaminação, observado em estudos publicados, já que, este é o tipo de pimenta que sofre maior tempo de secagem e armazenamento durante o processo de beneficiamento.

As amostras adquiridas em grãos foram moídas no laboratório. A tabela a seguir, demonstra o quantitativo de amostra de acordo com o tipo de produção.

Tabela 3: número de amostras e o tipo de produção.

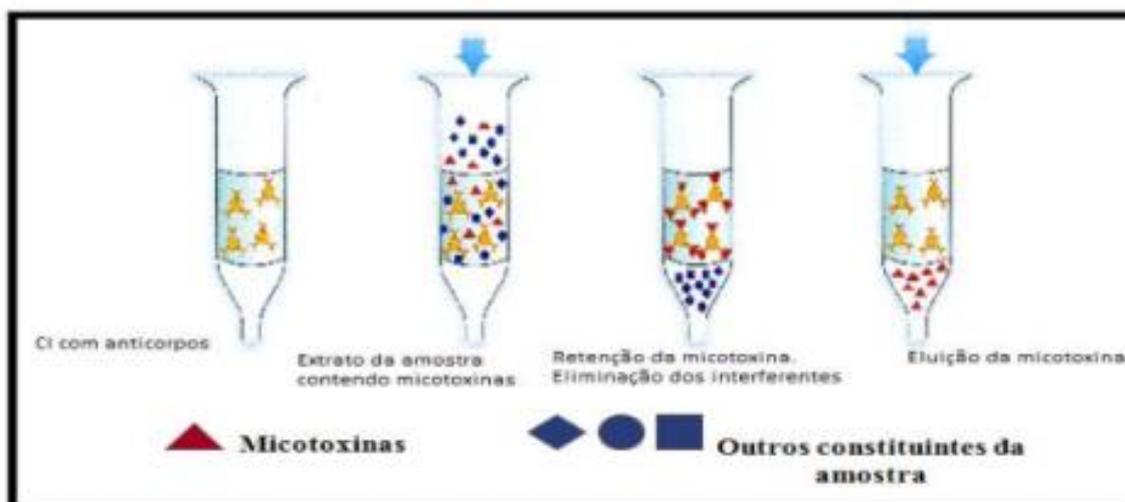
<b>AMOSTRA</b>	<b>NÚMERO DE AMOSTRAS</b>
A GRANEL	09
INDUSTRIALIZADA	09

### 3.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados foram: balança analítica, capela de exaustão, Blender (WARRING), moinho M20 (IKA®-WERKE) centrífuga com refrigeração (HITACHI, CF 7D2), bomba de vácuo (MILLIPORE), ultrassom (BRANSON, 2510), Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/F) (Shimadzu UPLC-20AD) para ocratoxina A e Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/F) (Shimadzu CLASS LC10) para aflatoxinas, membrana para filtração PVDF com 0,22 µm de poro (MILLIPORE), coluna de imunoafinidade para ocratoxina A (OCRAPREP®, R-BIOPHARM, RHÔNE), e aflatoxinas (EASI-EXTRACT® AFLATOXIN, R-BIOPHARM, RHÔNE).

As colunas de imunoafinidade (CIA) são preparadas com anticorpos anti-micotoxinas que possibilitam a extração da toxina de interesse em diferentes matrizes. As colunas de imunoafinidade conferem rapidez, simplicidade, alta especificidade e recuperação, melhorando os limites de detecção do método (FUJII et al., 2002; SHARMAN et al., 1992). A figura abaixo ilustra o princípio da coluna de imunoafinidade.

Figura 3 adaptada: mecanismo de funcionamento da coluna de imunoafinidade.



Fonte: <http://www.r-biopharm.com/news/press-releases/r-biopharm-rhones-official-Launch>.

As colunas são compostas de um suporte de fase sólida ativada, no qual imobilizam os anticorpos específicos contra determinada micotoxina. O processo de limpeza consiste na ligação seletiva de micotoxinas presente no extrato aos anticorpos da coluna, seguido de eluição com solvente de extração previamente determinado.

### 3.3 PADRÕES E REAGENTES

- Aflatoxinas

O padrão de AF usado foi da marca Sigma & Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e os solventes orgânicos e reagentes usados foram: acetonitrila grau CLAE; cloreto de sódio, metanol grau CLAE.

Foram preparadas as seguintes soluções para análise das amostras: acetonitrila para CLAE, água deionizada, metanol, PBS (phosphate buffered saline) para análise das amostras.

- Ocratoxina A

O padrão de OTA usado foi da marca Sigma & Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e os solventes orgânicos e reagentes usados foram: acetonitrila grau CLAE; metanol grau CLAE, ácido acético glacial para análise (P.A.) e tolueno P.A.

Foram preparadas as seguintes soluções para análise das amostras: solução de ácido acético/ tolueno 9:1 v/v, acetonitrila para CLAE, água deionizada, metanol e solução PBS (phosphate buffered saline) para análise das amostras.

### 3.4 VIDRARIAS

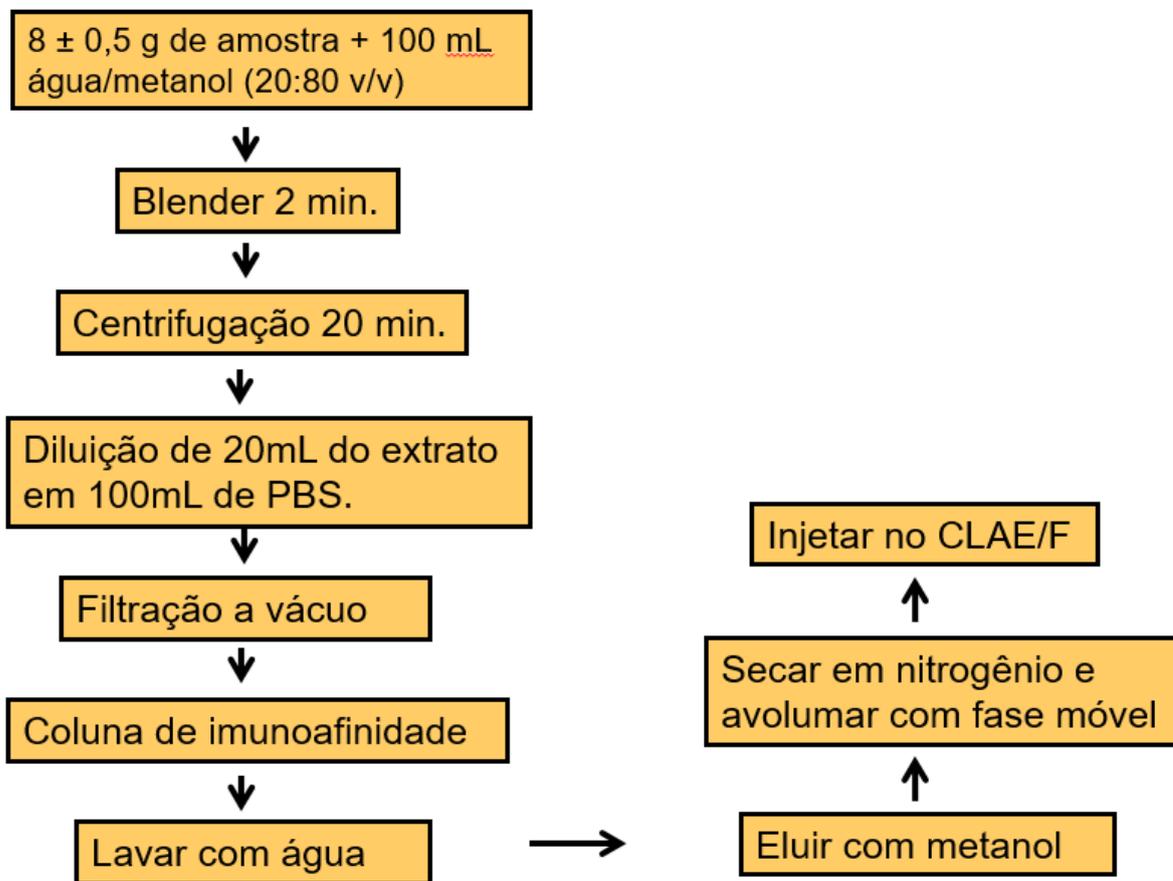
Foram usadas pipetas volumétricas de 50mL, 10mL, e 5mL, seringa com volume de 20mL e de 5mL, balão de 100 mL, vials próprios para cromatografia líquida. Pipetas e balões usados estavam calibrados e os certificado de calibração rastreáveis à norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR/ISO/IEC 17025.

### 3.5 PREPARO DA AMOSTRA

- Aflatoxinas

Foram pesadas  $8 \pm 0,5$  gramas da amostra e adicionado o solvente orgânico para extração da ocratoxina em “blender” por 2 minutos em velocidade alta. Após a extração a amostra é centrifugada por 20 minutos. Uma alíquota de 20 ml do extrato é transferida para balão volumétrico de 100ml, avolumado com solução tampão PBS, e depois filtrada para eliminar as sujidades. Uma alíquota de 50 ml é eluída através de coluna de imunoafinidade que contém anticorpos monoclonais para Aflatoxinas, em seguida, a CIA foi lavada com água destilada, por duas vezes. Para a extração da AF na CIA utiliza-se 1,5 ml de metanol. Então o extrato é evaporado em banho maria (+/-45°C) sob atmosfera inerte de nitrogênio e avolumada com 1mL fase móvel para então ser injetado no equipamento.

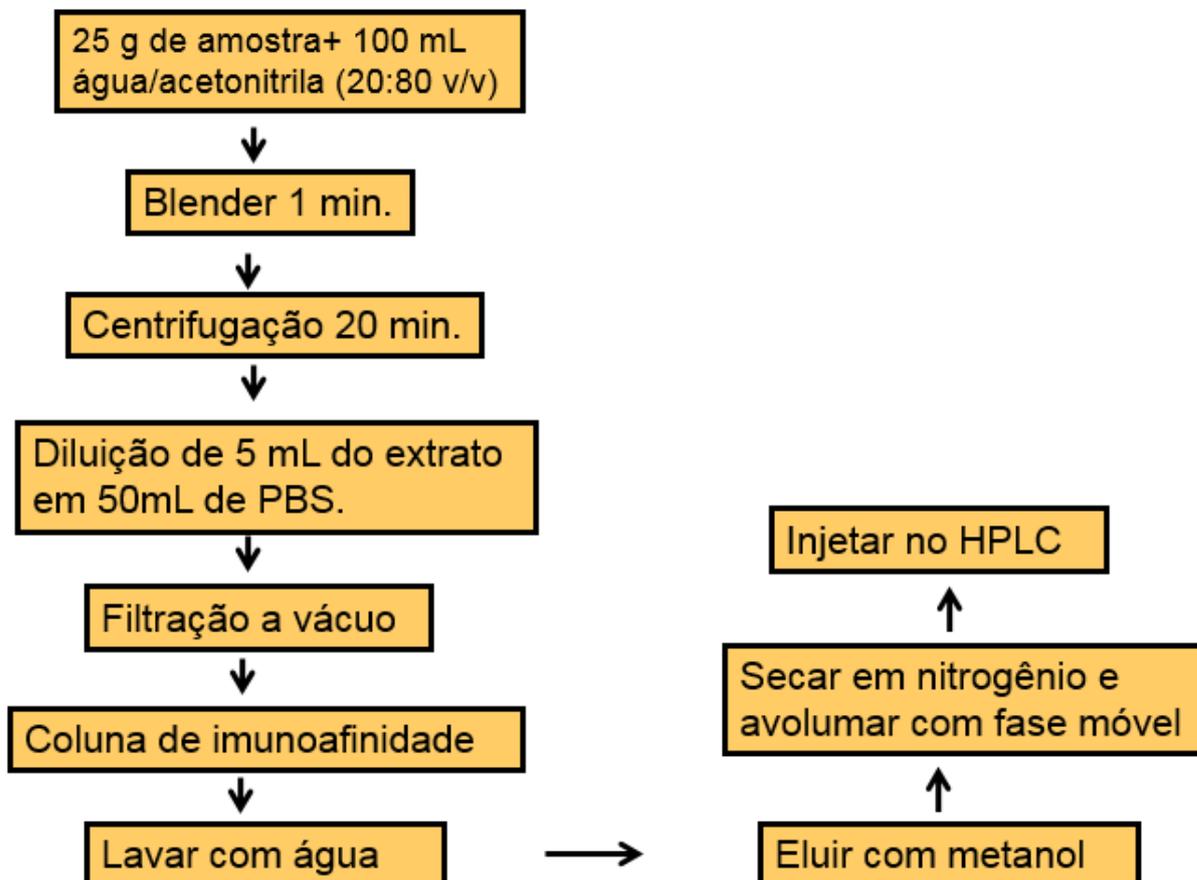
Figura 4: fluxograma do método para análise de Aflatoxinas.



- Ocratoxina A

Foram pesadas  $25 \pm 0,5$  gramas da amostra e adicionado o solvente orgânico para extração da ocratoxina A em “blender” por um minuto em velocidade alta. Após a extração a amostra foi centrifugada por 20 minutos. Uma alíquota de 5 ml é transferida para balão de 50 ml e avolumado com Solução tampão PBS (phosphate buffered saline), e posteriormente filtrada para eliminar e eluída através de coluna de imunoafinidade contendo anticorpos para Ocratoxina A. Em seguida, a CIA é lavada com água destilada. Para a extração da ocratoxina A da CIA de utiliza-se 1,5 ml de metanol. Então o extrato é evaporado em banho maria (+/-45°C) sob atmosfera inerte de nitrogênio e avolumada com 1mL fase móvel para então ser injetada no equipamento.

Figura 5: fluxograma do método para análise de Ocratoxina.



### 3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

- Aflatoxinas

A separação e quantificação das AFs foi realizada em um sistema de Cromatografia com detector de fluorescência (excitação: 340 nm e emissão: 460 nm) com coluna C18 (WATERS) 4,6 X 250mm, precedida de pré-coluna (WATERS) 4,6 X 25mm.

A fase móvel utilizada consiste em acetoneitrila, metanol e água 20:20:60 v/v. A CIA foi eluída isocraticamente em um fluxo de 1 mL/min de fase móvel. Nestas condições o tempo de retenção das aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 E AFG2 foi de aproximadamente 24, 20, 17, e 14 minutos respectivamente, o que significa que nesses tempos, surgem os picos no cromatograma, representando cada AF.

Os solventes utilizados foram os recomendados para cromatografia líquida e a água foi purificada pelo sistema de ultrafiltração (MILLI-Q). O volume de injeção foi de 50  $\mu\text{L}$ .

- Ocratoxina A

A separação e detecção da OTA foi realizada em um sistema de Cromatografia com detector de fluorescência (excitação: 333nm e emissão: 460nm) com coluna C18 (WATERS) 4,6 X 250mm, precedida de pré-coluna (WATERS) 4,6 X 25mm.

A fase móvel utilizada consiste em uma solução contendo ácido acético, e acetonitrila e água purificada 2:47:51 v/v. A CIA foi eluída isocraticamente em um fluxo de 1 mL/min de fase móvel. Nestas condições o tempo de retenção da OTA foi de aproximadamente 10 minutos, o que significa que nesse tempo, surge o pico no cromatograma, representando a OTA.

Os solventes utilizados foram os recomendados para cromatografia líquida e a água foi purificada pelo sistema de ultrafiltração (MILLI-Q). O volume de injeção foi de 20 ou 50  $\mu\text{L}$ , dependendo da concentração da Ocratoxina A presente na amostra.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

Para a validação do método analítico proposto para as aflatoxinas foram testados 3 diferentes métodos para encontrar o mais adequado à matriz pimenta do reino levando em conta as condições analíticas do laboratório. O método analítico proposto para ocratoxina A não foi totalmente validado, o processo ainda está em andamento.

A tabela 4 relaciona os métodos com suas respectivas referências.

Tabela 4: métodos utilizados para propor a validação das aflatoxinas e suas respectivas referências.

<b>MÉTODO</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
Método 1	POP 65.3120.162 (laboratório de micotoxinas)
Método 2	(SHUNDO, L. et al., 2009)
Método 3	(OZBEY; KABAK, 2012)

O método analítico 3 foi o método que apresentou um extrato final mais límpido, possibilitando uma melhor detecção das aflatoxinas, tendo sido modificado pelo laboratório. As modificações realizadas foram a quantidade de massa pesada de  $50 \pm 0,5\text{g}$  para  $8 \pm 0,5\text{g}$ , com isso todos os reagentes foram também reduzidos proporcionalmente evitando um grande consumo de solventes. A mistura foi centrifugada ao invés de filtrada e as aflatoxinas eluídas da CIA com 1,5mL de fase móvel, pois para este trabalho foram utilizadas as colunas da R<sup>®</sup>Biopharm que possuem um número maior de anticorpos do que a utilizada pelo método de Ozbey; Kabak (2012) que se apresenta com um menor número de anticorpos. A confirmação da identidade das aflatoxinas B1 e G1 foi realizada com solução de iodo por derivação pós-coluna, enquanto os autores Ozbey; Kabak (2012), usaram a célula de Kobra Cel<sup>®</sup>, a base de Bromo.

Foram avaliados os seguintes parâmetros de validação para as aflatoxinas simultaneamente: seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão e recuperação.

Para avaliar a linearidade do método, foram construídas curvas de calibração com sete níveis de concentração e a estatística aplicada encontra-se na tabela 06, pagina 29. A linearidade foi determinada por análise de regressão linear e expressa como coeficiente de correlação do gráfico ( $R^2$ ), usando a área do pico x a concentração do analito.

A seletividade do método foi avaliada através da análise de amostras branco (não fortificada) verificando a ausência de pico interferente nos tempos de retenção correspondentes.

A sensibilidade do CLAE/F foi expressa em termos de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), assim foram calculados a relação sinal/ruído (S/R) para cada uma das aflatoxinas considerando  $3 \times (S/R)$  e  $10 \times (S/R)$ . A tabela 5 demonstra o LQ e LD das aflatoxinas.

Tabela 5: LQ e LD do método estudado para as aflatoxinas.

AFLATOXINAS	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)
B1	0,177	0,59
B2	0,066	0,22
G1	0,237	0,79
G2	0,078	0,26

As concentrações encontradas foram fortificadas em amostras branco com soluções padrões das aflatoxinas de concentrações adequadas e processada a quantificação dessas amostras.

A precisão do método foi verificada em termos de repetibilidade por amostras fortificadas e processadas em paralelo sendo determinada a concentração no mesmo dia e em dias diferentes. A precisão foi avaliada pelo o desvio padrão relativo (DPRr).

A exatidão do método analítico foi avaliada através da recuperação, calculada conforme fórmula abaixo, onde a concentração medida é dividida pelo valor da concentração fortificada multiplicado por 100.

$$\% \text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração medida}}{\text{Concentração fortificada}} \times 100$$

#### 4.1.1 Resumo da Validação para Aflatoxinas

Tabela 6: estatística das curvas analíticas utilizadas na validação das amostras de pimenta do reino na determinação das aflatoxinas.

CURVA ANALÍTICA AFLATOXINA B1			
FAIXA DE CONCENTRAÇÃO (µg/L)	(R <sup>2</sup> )	Nível (K)	EQUAÇÃO
0,470 a 3,50	0,9998	6	Y = 28939X – 2161,8
0,050 a 0,946	0,9976	7	Y = 31458 X – 388,07

<b>CURVA ANALÍTICA AFLATOXINA B2</b>			
FAIXA DE CONCENTRAÇÃO (µg/L)	(R <sup>2</sup> )	Nível (K)	EQUAÇÃO
0,040 a 0,867	0,9988	7	Y = 83821X – 106,05
0,430 a 3,199	0,9992	6	Y = 77721x – 1113,8
<b>CURVA ANALÍTICA AFLATOXINA G1</b>			
FAIXA DE CONCENTRAÇÃO (µg/L)	(R <sup>2</sup> )	Nível (K)	EQUAÇÃO
0,040 a 0,848	0,9959	7	Y = 16869 X – 363,29
0,775 a 2,712	0,9964	6	Y = 15459X – 294,03
<b>CURVA ANALÍTICA AFLATOXINA G2</b>			
FAIXA DE CONCENTRAÇÃO (µg/L)	(R <sup>2</sup> )	Nível (K)	EQUAÇÃO
0,400 a 3,008	0,9995	6	Y = 31375 X – 1212,6
0,031 a 0,386	0,9958	7	Y = 40756 X – 580,99

As premissas estatísticas adotadas para avaliação das curvas de calibração foram a homocedasticidade (teste de Levene), teste de normalidade (Ryan-Joiner), autocorrelação de resíduos (Durbin-watson) e o teste de significância da regressão Lack-of-fit. As curvas de calibração para as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, apresentaram valores de coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) maiores que 0,98 recomendado pelo INMETRO, (2011) apresentando uma linearidade satisfatória. Dentre as premissas estatísticas avaliadas, as curvas de calibração para as aflatoxinas não apresentaram desvio de linearidade, não apresentaram autocorrelação de resíduos, seguem a normalidade, possuem homocedasticidade de variâncias, e a regressão linear é significativa para as AFs estudadas. Portanto, o intervalo de trabalho mostrou-se linear com comportamento homocedástico e regressão linear significativa para as AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 na faixa de concentração estudada.

#### 4.1.2 Resumo da Validação do método para aflatoxina B1

A recuperação da aflatoxina B1 foi determinada em pimenta do reino preta nas concentrações de 0,59, 1,27 e 3,46  $\mu\text{g}/\text{kg}$  em um experimento com duas amostras paralelas, com  $n=2$  injeções para cada extrato. O limite de quantificação foi calculado pelo método sinal/ruído, e a concentração obtida foi o primeiro nível de fortificação apresentado na tabela abaixo igual a 0,59  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Tabela 7: resultados das amostras de pimenta fortificadas com aflatoxinas B1.

<b>Fortificação (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>DPR<sub>r</sub><sup>a</sup></b>	<b>DPR<sub>r</sub> (%)<sup>a</sup></b>	<b>Recuperação (%)</b>
0,590*	0,001	0,413	52,8
1,270*	0,009	0,90	54,2
3,465*	0,017	0,892	56,6

\*  $n=2$ , média de 2 alíquotas independentes; (a) Desvio padrão relativo no mesmo dia.

Tabela 8: precisão Intermediária da metodologia proposta para aflatoxina B1, LOQ ( $n=2$ ; alíquota independente), preparadas e injetadas em dias diferentes, e o resultado avaliado pelo DPR<sub>r</sub> (desvio padrão relativo) em percentual (%), conforme tabela a seguir.

<b>Fortificação (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>DPR<sub>r</sub> (%)<sup>a</sup></b>	<b>DPR<sub>R</sub> (%)<sup>b</sup></b>
0,590	0,41	4,92

(a) Desvio padrão relativo no mesmo dia; (b) Desvio padrão relativo em dias diferentes

A recuperação da AFB1 se manteve abaixo de 70% exigido pelos documentos da Comunidade Européia, (2006) ou INMETRO (Instituto Nacional De Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), (2011), com isso, foi realizado um aumento no tempo de extração recomendado pelos autores OZBEY e KABAK, (2012) para 2 minutos, o que resultou numa melhor exatidão do método para AFB1 conforme os valores expressos na linha 2 da tabela 9. Nesse mesmo nível de concentração foi realizado a precisão intermediária, com preparo e injeção das amostras em dias diferentes, e o resultado avaliado pelo DPR<sub>r</sub> (%) na tabela 9.

Tabela 9: precisão Intermediária do método proposto para a aflatoxina B1, avaliada na concentração de AFB1= 2,35 µg/Kg (n=2), preparadas e injetadas no mesmo dia, linha 2 e em dias diferentes, linha 3 expressos na tabela abaixo e avaliada pelo DPR<sub>R</sub> (%).

<b>Fortificação (µg/Kg)</b>	<b>DPR<sub>r</sub> (%)<sup>a</sup></b>	<b>DPR<sub>R</sub> (%)<sup>b</sup></b>
2,351*	0,02	-
2,351	0,23	10,4

\*n=2 (média de 2 alíquotas independentes); (a) Desvio padrão relativo no mesmo dia; (b) Desvio padrão relativo em dias diferentes.

#### 4.1.3 Resumo da Validação do método para aflatoxina B2

A recuperação da aflatoxina B2 foi determinada em pimenta do reino preta nas concentrações de 0,22, 0,93, 1,94 e 3,57 µg/kg em um experimento com duas amostras paralelas, com n=2 injeções cada extrato, como mostra a tabela 10. O limite de quantificação foi calculado pelo método sinal/ ruído, e a concentração obtida foi igual a 0,22 µg/kg.

Tabela 10: resultados das amostras de pimenta fortificadas com aflatoxinas B2.

<b>Fortificação (µg/kg)</b>	<b>DPR<sub>r</sub><sup>a</sup></b>	<b>DPR<sub>r</sub> (%)<sup>a</sup></b>	<b>Recuperação (%)</b>
0,22*	0,009	4,77	86,3
0,93*	0,022	2,35	100,6
1,94*	0,031	2,014	78,0
3,57*	0,003	0,113	84,4

\* n=2, média de 2 alíquotas independentes; (a) Desvio padrão relativo no mesmo dia.

Tabela 11: precisão Intermediária da metodologia proposta para aflatoxina B2, LOQ (n=2; alíquota independente), preparadas e injetadas em dias diferentes, e o resultado avaliado pelo DPR<sub>r</sub> (%) conforme tabela abaixo.

<b>Fortificação (µg/kg)</b>	<b>DPR<sub>r</sub> (%)<sup>a</sup></b>	<b>DPR<sub>R</sub> (%)<sup>b</sup></b>
0,22	0,044	2,92

(a) Desvio padrão relativo no mesmo dia; (b) Desvio padrão relativo em dias diferentes.

Apesar da recuperação ter sido satisfatória para a AFB2 em todos os níveis de concentração testados, o aumento no tempo de extração para 2 minutos também foi aplicado a mesma. Para esse mesmo nível de concentração foi realizado a precisão intermediária, com preparo e injeção das amostras em dias diferentes, e o resultado avaliado pelo  $DPR_R$  (%), expresso na linha 3 da tabela 12.

Tabela 12: precisão Intermediária da metodologia proposta para aflatoxina B2, avaliada na concentração de B2= 2,731  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (n=2), preparadas e injetadas no mesmo dia, linha 2 e em dias diferentes, linha 3 da tabela abaixo.

<b>Fortificação (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>DPR<sub>r</sub> (%)</b>	<b>DPR<sub>R</sub> (%)<sup>b</sup></b>
2,731*	3,04	-
2,731	3,99	5,99

\*n=2 (média de 2 alíquotas independentes).

#### 4.1.4 Resumo da Validação do método para aflatoxina G1

A recuperação da aflatoxina G1 foi determinada em pimenta do reino preta nas concentrações de 0,79, 1,59, 3,32 e 6,19  $\mu\text{g}/\text{kg}$  em um experimento com duas amostras paralelas, com n=2 injeções cada extrato, como demonstra a tabela 13. O limite de quantificação foi calculado pelo método sinal/ ruído, e a concentração obtida foi o primeiro nível de fortificação igual a 0,79 $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Tabela 13: resultados das amostras de pimenta fortificadas com aflatoxinas G1.

<b>Fortificação (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>DPR<sub>r</sub><sup>a</sup></b>	<b>DPR<sub>r</sub> (%)<sup>a</sup></b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>0,79*</b>	0,035	7,8	57,1
<b>1,59*</b>	0,098	11,5	56,0
<b>3,32*</b>	0,03	1,57	57,6
<b>6,19*</b>	0,042	1,29	52,18

\* n=2, média de 2 alíquotas independentes; (a) Desvio padrão relativo no mesmo dia.

A recuperação da AFG1 se manteve abaixo de 70% exigido pelos documentos da Comunidade Européia, (2006) ou INMETRO, (2011), e mesmo com aumento no tempo de extração de 1 para 2 minutos, a recuperação não resultou numa melhor exatidão do método para G1, diferentemente do que foi observado para AFB1. Os valores expressos na tabela acima, nos diferentes níveis testados com 1 ou 2 min de extração, a recuperação do método se manteve em torno de 50%.

Na tentativa de verificar se a recuperação abaixo de 70% também se repetiria em concentrações mais altas, foi feita uma amostra fortificada com 6,19 µg/kg de G1 em dias diferentes, e foi observado que mesmo com a fortificação em concentração mais alta, a recuperação se manteve abaixo do valor exigido.

Tabela 14: precisão Intermediária da metodologia proposta para aflatoxina G1, no LOQ, 0,79 e 6,19 µg/kg (n=2; alíquota independente), preparadas e injetadas em dias diferentes, e o resultado avaliado pelo DPR<sub>r</sub> (%).

<b>Fortificação (µg/kg)</b>	<b>DPR<sub>r</sub> (%)<sup>a</sup></b>	<b>DPR<sub>R</sub> (%)<sup>b</sup></b>
0,79	0,030	6,68
6,19	0,103	3,04

(a) Desvio padrão relativo no mesmo dia; (b) Desvio padrão relativo em dias diferentes.

#### 4.1.5 Resumo da Validação do método para aflatoxina G2

A recuperação da aflatoxinas G2 foi determinada em pimenta do reino preta nas concentrações de 0,257, 1,101, 2,055 e 2,932 µg/kg em um experimento com duas amostras paralelas, com n=2 injeções cada extrato, demonstrado na tabela 15. O limite de quantificação foi calculado pelo método sinal/ ruído, e a concentração obtida foi o primeiro nível de fortificação igual a 0,257µg/kg.

Tabela 15: resultados das amostras de pimenta fortificadas com aflatoxinas G2.

<b>Fortificação (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>DPR<sub>r</sub><sup>a</sup></b>	<b>DPR<sub>r</sub> (%)<sup>a</sup></b>	<b>Recuperação (%)</b>
0,257*	0,003	1,23	96,4
1,101*	0,073	8,96	73,9
2,055*	0,136	7,30	90,8

\* n=2, média de 2 alíquotas independentes; (a) Desvio padrão relativo no mesmo dia.

Tabela 16: Precisão Intermediária da metodologia proposta para aflatoxina G2, LOQ (n=2; alíquota independente), preparadas e injetadas em dias diferentes, e o resultado avaliado pelo DPR<sub>r</sub> (%) conforme tabela abaixo.

<b>Fortificação (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>DPR<sub>r</sub><sup>a</sup></b>	<b>DPR<sub>R</sub> (%)<sup>b</sup></b>
0,257	1,23	1,003

(a) Desvio padrão relativo no mesmo dia; (b) Desvio padrão relativo em dias diferentes.

Apesar da recuperação da aflatoxina G2 ter sido satisfatória, foi realizado um aumento no tempo de extração para 2 minutos também para esta aflatoxina, com uma amostra fortificada no nível de concentração de 2,351  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e os resultados expressos na linha 2 da tabela 16. Nesse mesmo nível de concentração foi realizado a precisão intermediária, com preparo e injeção das amostras em dias diferentes, e o resultado avaliado pelo DPR<sub>R</sub> (%) expresso na linha 3 da tabela 17.

Tabela 17: precisão Intermediária para a metodologia proposta para aflatoxina G2, avaliada na concentração de G2= 2,055  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (n=2), injetadas no mesmo dia, linha 2; e preparadas em dias diferentes, linha 3, expressos na tabela abaixo e avaliada pelo DPR<sub>R</sub> (%).

<b>Fortificação (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>DPR<sub>r</sub><sup>a</sup></b>	<b>DPR<sub>r</sub> (%)</b>	<b>DPR<sub>R</sub> (%)<sup>b</sup></b>
2,055*	0,136	7,30	-
2,055	0,147	-	8,4

\*n=2 (média de 2 alíquotas independentes); (a) Desvio padrão relativo no mesmo dia; (b) Desvio padrão relativo em dias diferentes

O método modificado se mostrou adequado à determinação das aflatoxinas em pimenta do reino quando aumentado o tempo de extração para 2 minutos, ocorrendo um aumento significativo na recuperação de B1, testado na concentração de 2,351 µg/kg. Embora não tenha ocorrido o mesmo com a AFG1, o intervalo de 70% a 110%, para exatidão de um método, recomendado pelos documentos da Comunidade Européia, (2006) ou INMETRO, (2011), foi atingido, visto que a legislação não considera, para o limite máximo tolerável, cada aflatoxina individualmente, mas sim o somatório total das aflatoxinas. Quanto a precisão, o método mostrou-se preciso, com valores de  $DPR_R$  menores que 16%, remendado pela legislação.

Não foi possível repetir o processo nas demais concentrações por falta de coluna de imunoafinidade, tão pouco analisar um número maior de amostra, desta forma este trabalho em relação ao número de amostras analisadas (Tabela 17) não configura um monitoramento e sim uma avaliação da contaminação de amostras de pimenta do reino, comercializadas como produto industrializado ou a granel, na cidade do Rio de Janeiro durante o ano de 2016.

#### 4.2 RESULTADO ENCONTRADO NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM PIMENTA DO REINO

O método validado foi aplicado a amostras de pimenta do reino, e os resultados de ocorrência e os níveis de contaminação por aflatoxinas estão representados na tabela 18. Os resultados foram comparados com os dados da literatura, bem como os limites máximos toleráveis.

Das 18 amostras analisadas, 7 apresentaram contaminação por aflatoxinas, com concentração na faixa de 0,38-2,24 µg/kg, e média de 1,24 µg/kg. Nenhuma das amostras apresentou contaminação acima do limite máximo tolerável preconizado pela Anvisa (2011) de 20 µg/kg para aflatoxinas.

Tabela 18: resultado da determinação de Afs em amostras de pimenta do reino analisadas.

Tipo de pimenta	Positivo/Nºamostra	Amostra	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	Total Afs
preta	7/18	1	1,13	Tr	ND	ND	1,13
		2	0,98	Tr	ND	ND	0,98
		3	1,13	Tr	ND	ND	1,13
		4	0,79	Tr	ND	ND	0,79
		5	2,04	Tr	ND	ND	2,04
		6	0,38	Tr	ND	ND	0,38
		7	2,24	Tr	ND	ND	2,24

Tr= traços (LD < Traços < LQ); ND= Não Detectado (ND < LD).

As Figuras 6, 7 e 8 representam os cromatogramas da amostra de pimenta do reino preta naturalmente contaminada, o padrão de aflatoxinas, e da amostra não contaminada, respectivamente, nas condições cromatográficas descritas anteriormente.

Figura 6: cromatograma da amostra de pimenta do reino naturalmente contaminada por aflatoxinas, obtido por CLAE/F. Os símbolos B1 e B2 representam as aflatoxina B1 e B2 com seus respectivos tempos de retenção de 24.258 e 20.042 minutos.

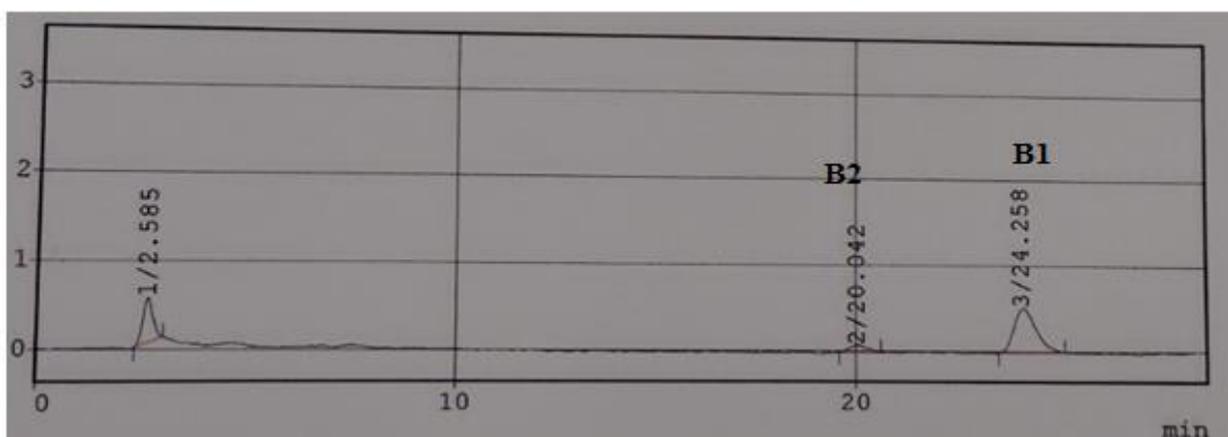


Figura 7: cromatograma do padrão de aflatoxinas, obtido por CLAE/F, aplicado sobre solvente a uma concentração de 0,70 ng/mL de AFB1, 0,25 ng/mL de AFB2, 0,79 ng/mL de AFG1 ng/mL e 0,26 ng/mL de AFG2. Os símbolos B1, B2, G1 e G2 escrito no cromatograma representam as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 com seus respectivos tempos de retenção de 24.270, 20.241, 14.255 e 14.533 minutos.

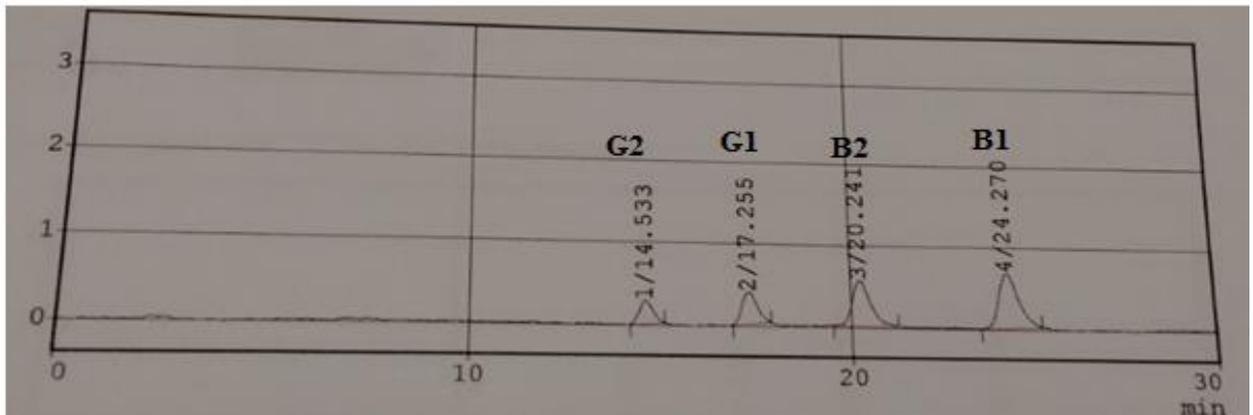
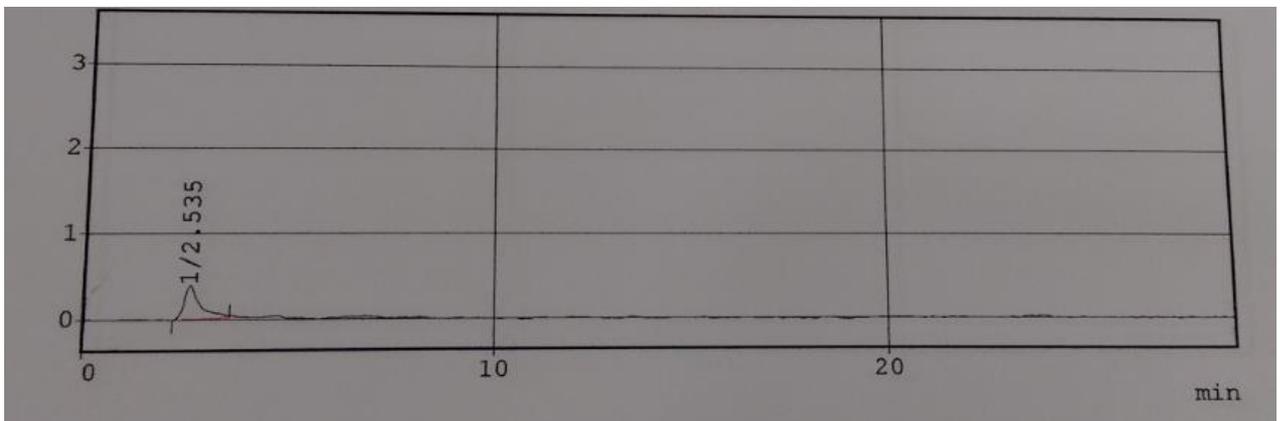


Figura 8: cromatograma da amostra de pimenta reino não contaminada, obtida por CLAE/F. O pico presente na figura não representa contaminação por aflatoxinas.



Nos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível observar a presença de AF somente dos tipos B1 e B2 nas amostras de pimenta do reino contaminadas por aflatoxinas. Não foram encontrados os tipos G1 e G2. Isso pode ser explicado pelo tipo de fungo predominante em regiões tropicais que possuem maior afinidade pela pimenta do reino. A invasão dos fungos *A. flavus* em vez de *A. parasiticus* são responsáveis pela alta incidência de aflatoxinas B1 e B2 nas amostras analisadas.

Esta ocorrência pode ser confirmada pelo estudo realizado nas regiões do Pará e Espírito Santo (duas das regiões de maior produção de pimenta do reino do Brasil), Gatti et al. (2003) analisaram a predominância da produção de fungos filamentosos em pimenta do reino preta nessas regiões e detectaram a presença de fungos em 99,1% das amostras analisadas, sendo que 53,5% eram da espécie *Aspergillus flavus*. Foram isoladas 13 espécies de *A. flavus*, em um total de 56 capazes de produzir aflatoxinas.

Outro parâmetro avaliado foi a comparação dos níveis de contaminação de amostras de pimenta do reino a granel e industrializada. Das 7 amostras contaminadas por aflatoxinas 4 são industrializadas (compradas em mercados) e 3 são a granel (compradas em lojas de produtos naturais). Esses dados não permitem gerar uma hipótese, pois seria necessário um número amostral representativo para chegar a uma conclusão, entretanto, observa-se a importância da realização de um monitoramento para avaliar a contaminação por micotoxinas na pimenta do reino que é vendida nos mercados do Brasil, visto que, trata-se de um condimento muito utilizado na culinária doméstica e industrial.

Analisando os resultados obtidos com dados da literatura, podemos observar que a ocorrência de aflatoxinas em pimenta do reino possui uma vasta coleção de trabalhos publicados, em decorrência da toxicidade e do efeito carcinogênico. Neste estudo, 7 das 18 amostras apresentaram contaminação por aflatoxinas, ao passo que na Turquia, um estudo de Erdogan, (2004) detectou contaminação por AFB1 em 11 das 44 amostras analisadas, com concentração de 1,1 a 97,5 µg/kg. Bircan (2005), também na Turquia, detectou aflatoxina B1 em 4 das 15 amostras de pimenta preta em concentração inferior a 5,0 µg/kg. Recentemente, Ozbey e Kabak (2012), analisaram 23 amostras de pimenta do reino preta e detectaram 7 amostras contaminadas por AFs, com nível de contaminação entre 0.1 e 0.46 µg/kg.

Em um levantamento de especiarias realizados no Marrocos, Zinedine et al. (2006) detectaram aflatoxinas em 13 das 15 amostras de pimenta do reino preta, com níveis inferiores a 1,0 µg/kg. Fazekas et al. (2005) encontraram aflatoxina B1 em 18 das 70 amostras de pimenta. Na Itália, Prella et al. (2014) analisaram 30 amostras de pimenta do reino e 16,6% apresentaram contaminação por aflatoxinas.

Um estudo realizado na Coreia, com 57 amostras de pimenta do reino (pimenta preta e vermelha), Cho et al. (2008) encontraram contaminação por AFs em 9

amostras com nível de contaminação de 0.08 a 4.66 µg/kg. Quando comparado ao presente estudo, pode ser observado que a contaminação por aflatoxinas está numa concentração bem menor (0,38-2,24µg/kg) que o estudo realizado na Coreia.

Outra micotoxina que também é encontrada em pimenta do reino como mencionado anteriormente, é a Ocratoxina A. Estudos na literatura demonstram que diversos países estão preocupados com a questão. Na Turquia, Ozbey e Kabak (2012) encontram 4 amostras positivas de pimenta preta (17,4%) com concentração variando entre 0.87 e 3.48 µg/kg. Jalili et al. (2012) observaram que 17 das 30 amostras de pimenta preta comercializadas na Malásia apresentaram contaminação por OTA com concentração entre 0,23 e 12,64 µg/kg, ao passo que, Fazekas et al. (2005) não encontraram amostras de pimenta do reino preta contaminadas por OTA em estudo realizado na Hungria. Em estudo realizado no Irã, das 23 amostras de pimenta do reino preta analisadas 10 apresentaram contaminação por ocratoxina A. (JALILI, 2016).

No presente estudo, não foi possível quantificar e corrigir os resultados da contaminação por OTA nas amostras de pimenta do reino analisadas, pois o processo de validação ainda está em andamento. Entretanto, a presença de OTA foi detectada em 12 das 18 amostras analisadas (67%), revelando uma alta ocorrência de OTA nas amostras de pimentas do reino analisadas.

Outros estudos também demonstraram alta incidência de OTA em pimenta do reino, na Polônia, Waskiewicz et al. (2013) encontraram contaminação por OTA em 14 das 16 amostras de pimenta do reino analisadas. Na Índia, Thirumala et al., (2001) analisaram a contaminação por OTA em 26 amostras de pimenta do reino preta e encontraram 14 amostras positivas com nível de contaminação entre 15-69 µg/kg.

A presença da contaminação AF e OTA simultaneamente na mesma amostra, foi observada em 3 das 18 amostras de pimenta do reino analisadas neste trabalho. Tal ocorrência caracteriza um risco à saúde do consumidor, visto que, a ingestão combinada de diferentes tipos de micotoxinas num mesmo alimento pode aumentar o risco de efeitos adversos para a saúde (SPEIJERS; SPEIJERS, 2004). Sedmikova et al. (2001) demonstraram que a OTA pode aumentar a mutagenicidade da AFB1 em casos de ocorrência simultânea no mesmo substrato.

Há muitos estudos com relação à incidência de duas ou mais micotoxinas em especiarias, entretanto para pimenta do reino, são poucos trabalhos publicados.

Hierro et al. (2008) Observaram que a co-ocorrência de AF e OTA em amostras de pimenta do reino comercializadas na Espanha foi de 7,1%. Em outro trabalho, a ocorrência simultânea de AFs e OTA foi detectada em 50% de especiarias, incluindo pimenta vermelha, Pimenta do reino preta e cominho comercializados na Tunusia (GHALI, 2008). Mais recentemente, Prella et al. (2014), encontraram 1 de 30 amostras de pimenta do reino analisadas com contaminação simultânea de OTA e AF num estudo realizado na Itália. Ozbey e Kabak (2008) e Ainiza et al. (2015) analisaram amostras de especiarias incluindo páprica, cominho, pimenta do reino, chili e não encontraram contaminação simultânea de AF e OTA em amostras de pimenta do reino. Contudo as amostras de páprica e chili apresentaram alto índice de contaminação simultânea.

A maioria dos estudos enfatizou que a razão para uma alta contaminação por micotoxinas é a suscetibilidade das especiarias à contaminação por fungos e, conseqüentemente, à produção de micotoxinas, ligada a condições ambientais, tais como umidade e temperatura de países produtores localizados em áreas tropicais e sub-tropicais. Os trabalhos publicados demonstraram que não somente a pimenta do reino é alvo da contaminação por micotoxinas, estudos com chili, páprica, cominho, pimenta cayena, gengibre, açafrão entre outras especiarias apresentaram contaminação por AF ou OCRA, além de outra micotoxina conhecida como zearalenona. (OZBEY; KABAK, 2008; ZHAO et al. 2013; PRELLE et al., 2014; AINIZA et al., 2015; JALILI, 2016).

No Brasil, poucas pesquisas sobre a ocorrência de micotoxinas foram realizadas em pimenta do reino. Nas regiões do Pará e Espírito santo (duas das principais regiões produtoras de pimenta do reino), Gatti et al. (2003) fizeram um monitoramento da contaminação de aflatoxinas em pimenta do reino preta e não encontraram aflatoxinas em nenhuma das 115 amostras analisadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Freire et al. (2000), na região da Amazônia, após analisarem a contaminação por aflatoxinas em 10 amostras de pimenta do reino preta e branca. Em Minas Gerais, Prado et al. (2008) realizaram um estudo de ocorrência de aflatoxinas em 30 amostras de pimenta do reino e também não encontraram amostras contaminadas. No Rio de Janeiro, esta é a primeira vez que é realizado um estudo sobre contaminação de aflatoxinas em pimenta do reino.

Comparando dados encontrados no Brasil com países produtores como Malásia, China entre outros, pode-se observar que as pimentas do reino produzidas no Brasil apresentam nível de contaminação menor quando comparado aos demais países produtores, com exceção da Turquia que apresentou o menor nível de contaminação por aflatoxinas, num estudo realizado em 2006 (COLAK, 2006). A tabela a seguir compara os níveis de contaminação por micotoxinas em pimenta do reino com os demais países produtores.

Tabela 19: comparação dos níveis de contaminação por AF E OTA em pimenta do reino entre alguns dos principais países produtores.

<b>PAÍS</b>	<b>NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>Brasil</b>	Abaixo do LQ	GATTI et al, 2003
<b>Malásia</b>	0.23 – 12,64 µg/kg (OTA)	JALILI et al., 2010
<b>China</b>	0,26- 27,52 µg/kg (AF)	ZHAO et al. 2013
<b>Índia</b>	15-69 µg/kg (OTA)	THIRUMALA et al., 2001
<b>Turquia</b>	0,3-0,23 µg/kg (AF)	COLAK, 2006
<b>Brasil</b>	0,38-2,24 µg/kg (AF)	(Presente trabalho)

A Índia é o segundo maior produtor de pimenta do reino do mundo, um estudo realizado em 2001, no país, avaliou o nível de contaminação por OTA em especiarias, e em 35,7% das amostras analisadas foram encontradas concentrações de OTA superiores ao nível máximo tolerável estabelecido pela Comunidade Europeia de 15 µg/kg. Enquanto a pimenta do reino preta, das 26 amostras analisadas, 6 apresentaram nível de contaminação de OTA acima do permitido quando comparada à legislação do Brasil de 30 µg/kg (THIRUMALA et al., 2001).

A legislação para aflatoxinas no Brasil ainda possui um limite máximo muito alto, se compararmos com a legislação do Japão, por exemplo, (5 µg/kg) permitindo que pimentas do reino proibidas de serem comercializadas em outros países sejam importadas e comercializadas no Brasil, expondo a saúde da população ao risco de contaminação e desenvolvimento de doenças. Atualmente, tem sido observada a demanda CODEX para que haja harmonização das legislações em todos os

continentes, bem como uma tendência à redução dos limites máximos permitidos, especialmente para as aflatoxinas.

O reconhecimento dos problemas causados pelas micotoxinas nos alimentos é, sem dúvida, o primeiro passo para a implementação de programas que permitam a adoção de medidas apropriadas para a prevenção e a redução do problema. É provável que em virtude do crescente intercâmbio de commodities entre os países, ocorra uma harmonização da legislação para micotoxinas em nível global.

## 5. CONCLUSÃO

O método analítico validado mostrou-se eficaz, seletivo e robusto, para obtenção da concentração de aflatoxinas em pimenta do reino, atendendo aos critérios de avaliação presentes nos documentos do INMETRO, e Comunidade Europeia.

Na avaliação da contaminação por aflatoxinas nas amostras, a predominância da aflatoxina B1 ficou bem estabelecida, o que configura um alerta por ser ela classificada pelo IARC (Grupo 1A) como carcinogênica ao homem podendo vir a se tornar um problema de saúde pública, principalmente nas regiões brasileiras onde o consumo dessa especiaria se faz de forma efetiva e diária.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABBASI, B.H. AHMAD, N.; FAZAL, H.; MAHMOOD, T. Conventional and modern propagation techniques in *Piper nigrum*. **J. Med. Plants. Res.**, v.4, n.1, p.7-12, 2010. **Food Control**, v.50, p.913-918, 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis. Edited by Cunniff, 16th Ed, V.II, Chapter 49, p. 37-41, 1995.
- AINIZA, W.M.W; JINAP, S.; SANNY, M. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in single and mixed spices. **Food Control**, v. 50, p. 913–918, 2015.
- BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.16, p. 497-516, 2003.
- BENKERROUM, N. Mycotoxins in dairy products: A review. **International Dairy Journal**, v. 62, p. 63-75, 2016.
- BIRCAN, C. The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC. **International Journal of Food Science & Technology**, v.40, n. 9 p. 929-934, 2005.
- BOMTEMPO, M. *Pimenta e seus benefícios à saúde*. São Paulo: Alaude, 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispões sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União. 9 março 2011. Seção 1:66.
- CARDOSO, J.F.R. et al. Avaliação do efeito tóxico da Piperina isolada da pimenta do reino (*Piper nigrum* L) em camundongos. **Rev. Univ. Rural**, v.25, n.1, p.85-91, 2005.
- CARNEVALLIA D. B.; ARAÚJO A. P. S. Atividade Biológica da Pimenta Preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de Literatura. **Uniciências**, v.17, n.1, p.41-46, 2013.
- COSTA, T.P.; GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Segurança alimentar e a cerveja: o perigo das micotoxinas. **Higiene Alimentar**, v.19, n.137, p.39-44, 2005
- CODEX ALIMENTARIUS. Código de prática. PREVENTION AND REDUCTION OF FOOD AND FEED CONTAMINATION 1st Edition, 2009.

COLAK, H.; BINGOL, E. B.; HAMPIKYAN, H.; NAZLI, B. Determination of Aflatoxin Contamination in Red-Scaled, Red and Black Pepper by ELISA and HPLC. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 14, n.3, p. 292-296, 2006.

CHARMLEY, L.L. et al. Factors responsible for economic losses due to Fusarium mycotoxin contamination of grain, foods and feedstuffs. In: **Mycotoxins in Grains**, St. Paul, p. 471, 1994.

CHAUDHRY, N.M.; TARIQ, P. Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. **Pak J. Pharm. Sci.**, v.19, n.3, p.214-218, 2006.

CHALFON, S. M.; BATISTA, L. R. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações de grãos de café (Coffe arábica L.). **Ciênc. Agrotec**, v. 31, n.3, p. 804-813, 2007.

CHO, et al. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. **Food Chemistry** v.107, p. 1283-1288, 2008.

CHU, FS. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research**, v. 259, p. 291-306, 1991.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Conjuntura pimenta-do-reino no Espírito Santo. 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em 26 de setembro de 2016.

COMMISSION REGULATION (EC) n. 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards Ochratoxin A. **Official Journal of European Union**, L.25/3-L.25/5.,2005.

COMMISSION REGULATION (EC) n. 401/2006 of 23 February 2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuff. **Official Journal of European Communities**. L70: pp.32.

CREPPY, E. E., et al. Human ochratoxicosis in France. **Journal of Toxicology and Toxin Review**, v. 18, p. 277-293, 1999.

DIDWANIA N.; JOSHI M. Mycotoxins: A critical review on occurrence and significance. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 5, n. 3, p. 1014-1019, 2013.

DHANYA, R.; MISHRA, B.B.; KHALEEL, K.M., CHERUTH, A.J. Shelf life extension of fresh turmeric (*Curcuma longa L.*) using gamma radiation. **Radiat.Phys.Chem**, v.78, p. 791–795, 2009.

DUARTE, T. L. Ocratoxina A em alimentos e bebidas: uma revisão bibliográfica. Tese (Graduação em Engenharia de Alimentos – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

Ee, G.C.L; LIM, C.M.; RAHMANI, M.; SHAARI, K; BONG, C.F.J. Pellitorine, a Potential Anti-Cancer Lead Compound against HL60 and MCT-7 Cell Lines and Microbial Transformation of Piperine from Piper Nigrum. **Molecules**, v.15, n.4, p.2398-2404, 2010.

ERDOGAN, A. The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey. **Chemosphere**, v. 56, p.321-325, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Manual segurança e qualidade para a cultura da pimenta-do-reino, EMBRAPA/SEDE, Brasília, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). A cultura da pimenta-do-reino. Embrapa Informação Tecnológica, ed.2, p.56, Brasília, 2006.

FAZEKAS, B.; TAR, A.; KOVÁCS, M. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. **Food Addit Contam.**, v.22, n.9, p.856-63, 2005.

FERREIRA, H. et al. AFLATOXINAS: UM RISCO A SAÚDE HUMANA E ANIMAL. **Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 2, p.113-127, 2006.

FUJII, S., et al. Ocratoxina A em café: controle e metodologia analítica com ênfase a inovação no contexto de segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n.2, p.273-292, jul./dez. 2002.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v.149, p.13-19, 2000.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, v. 48, n. 76, p. 133-147, 2007.

GACEM, M.A.; HADJKHELIL, A.O. Toxicology, biosynthesis, bio-control of aflatoxin and new methods of detection. **Asian Pac J Trop Biomed**, v.6, n.9, p.808–814, 2016.

GATTI, M. J.; FRAGA, M. E.; MAGNOLIS, C. DALCEROS, A. M.; ROSA, C. A. R. Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. **Food Addit. Contam.**, v.20, n.12, p.1120-1126, 2003.

GHALI, R.; HMAISSIA-KHLIFA, K.; GHORBEL, H.; MAAROUFI, K.; HEDILI, A. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods. **Food Control**, v. 19, p. 921-924, 2008.

HEUSSNER, A. H.; BINGLE, L., E. H. Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. **Toxins**, v. 7, p. 4253-4282, 2015.

HIERRO, H. J. M.; VILLANOVA, G. R. J.; TORRERO, P. R.; FONSECA, I. M. T. Aflatoxins and ochratoxin A in red paprika for retail sale in Spain: occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.3, p. 751-756, 2008.

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

IAMANAKA, B.T.; OLIVEIRA, I.S.; TANIWAKI, M.H. MICOTOXINAS EM ALIMENTOS. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vol. 7, p.138-161, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). DOQ-CGCRE-008 ver. 04. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro: INMETRO, JUL/2011, 24p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil. Rio de Janeiro: **IBGE**, v.29 n.1 p.1-83, 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) Em *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Lyon, 1993, vol. 56, 397.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Secretaria de Estado da Saúde. Secção de Química Biológica/Bioquímica. **Micotoxinas**, São Paulo, p.1-42, 1998.

JIAO, Y. et al. Identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gás chromatographu-mass spectrometry. **J. Chromatogr. Sci**, v. 595, 363-367, 1992.

JALILI, M. A. D., JINAP, S. C. N.; NORANIZAN. M. A. B. Aflatoxins and ochratoxin a reduction in black and white pepper by gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 81, p.1786–1788, 2012.

JALILI, M. Natural of Ochratoxin A Contamination in Commercial Spices in Tehran. **Nutrition and Food Sciences Research**, Iran, v. 3, n. 3, p. 25-30, 2016.

KHAN, S. et al. Development of RAPD markers for authentication of Piper nigrum (L.). **Environ We Int J Sci Tech.**, v.5, n.1, p.47- 56, 2010.

KÖSZEGI, T.; POÓR, M. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. **Toxins**, v. 8, p.1-25, 2016.

LOPES, P.R.S. et al. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesq. agropec. bras. Brasília**, v. 40, p.1029-1034, 2005.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. **Applied Environmental Microbiology**, Whashington, v.67, n.8, p.3630-3635, 2001.

LOURINHO, M. P. et al. Conjuntura da pimenta-do-reino no mercado nacional e na região norte do Brasil. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p.1016-1031, 2014.

MARIN, S.; RAMOS, A.J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food Chem Toxicol**, v. 60, p.218-237, 2013.

MAGAN, N.; OLSEN, M. Mycotoxins in food. Detection and control. CRC New York Washington, DC, pp. 488, 2004

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de Ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação humana**. v. 12. n.2, 2006.

OZBEY, B.; KABAK B. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. **Food Control**, Turquia, v. 28, p. 354-361, 2012.

PISSINATE, K. Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

PRELLE, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI A.; GULLINO, M. L. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices commercialized in Italy. **Food Control**, Itália, v. 39 p.192-197, 2014.

PRADO, G et al. Determinação de aflatoxina B1 em pimenta (*Piper nigrum L.*) e orégano (*Origanum vulgare L.*) por cromatografia em camada delgada e densitometria. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 514-517, 2008.

SEDMIKOVA, M., REISNEROVA, H., DUFKOVA, Z., BARTA, I., & JILEK, F. Potential hazard of simultaneous occurrence of aflatoxin B1 and ochratoxin A. **Veterinari Medicina**, v. 46, n.6, p.169-174, 2001.

SHUNDO, L.; et al. Aflatoxins and ochratoxin A in Brazilian paprika. **FoodControl**, v. 20, p. 1099-1102, 2009.

SHARMAN, M.; MACDONALDS, S.; GILBERT. J. Automated Liquid Chromatographic Determination of Ochratoxin A in Cereals and Animal Products Using Immunoaffinity Column Clean-up. **Journal of Chromatography**, v. 603, p.285-289, Amsterdam, 1992.

SANTOS, L., et al. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Capsicum powder samples available on the Spanish market. **Food Chemistry**, v.122, p. 826-830, 2010.

SPEIJERS, G. J. A.; SPEIJERS, M. H. M. Combined toxic effects of mycotoxins. **Toxicology Letters**, v.153, p.91-98, 2004.

TRUCKSESS, M. W., et al. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee. **J. Assoc. off Anal. Chem. Int.**, v. 82, p. 85-89, 1999.

THIRUMALA, D.; K., et al. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. **Food Additives and Contaminants**, v.18, p.830-835, 2001.

URBANO G. R. et al. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, 2001.

UYSAL, H; AGAR, G. Selenium Protective Activity Against Aflatoxin B1 Adverse Effects on Drosophila melanogaster, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 227-233, 2005.

VELMOUROUGANE, K.; PANNEERSELVAM, P.; SHANMUKHAPPA. D. R.; SRINIVASAN C. S.; NAIDU, R. Microbiological and biochemical aspects of robusta fermentation. In: The proceedings of the '**International Scientific Symposium on Coffee**', Bangalore, India, p. 172–178, 2000.

VIDAL, J. C. et al. Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v 49, p.146–158, 2013.

WASKIEWICZ, S. A.; BESZTERDA, M.; BOCIANOWSKI, J.; GOLINSKI, P. Natural occurrence of fumonisins and ochratoxin A in some herbs and spices commercialized in Poland analyzed by UPLC/MSMS method. **Food Microbiology**, v. 36, p. 426-431, 2013.

YOGENDRARAJAH, P. et al. Mycological quality and mycotoxin contamination of Sri Lankan peppers (*Piper nigrum* L.) and subsequent exposure assessment. **Food Control**, v. 41, p. 219-230, 2014.

ZINEDINE, A., et al. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and species commercialized in Morocco. **Food Control**, v.17, p. 868-874, 2006.

ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.15, p.129-144, 2011.

ZHAO, X.; SCHAFFNER, D.W.; YUE, T. Quantification of aflatoxin risk associated with Chinese spices: Point and probability risk assessments for aflatoxin B1. **Food Control** v.33, p.366-377, 2013.