



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

MARTINHO GAMAS DINIS MARTINHO

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ E G₂ NA
FARINHA DE MILHO PRODUZIDA EM NAMPULA,
MOÇAMBIQUE, E SUA AVALIAÇÃO DE RISCO
CARCINOGÊNICO

UFBA

SALVADOR

2023



MARTINHO GAMAS DINIS MARTINHO

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ E G₂ NA
FARINHA DE MILHO PRODUZIDA EM NAMPULA,
MOÇAMBIQUE, E SUA AVALIAÇÃO DE RISCO
CARCINOGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PGAli) da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. José Antônio Menezes-Filho

Orientador

SALVADOR

2023

Dados internacionais de catalogação-na-publicação
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Martinho, Martinho Gamas Dinis.

Ocorrência de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 na farinha de milho produzida em Nampula, Moçambique, e sua avaliação de risco carcinogênico / Martinho Gamas Dinis Martinho. - 2023.
86 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Menezes-Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2023.

1. Alimentos. 2. Alimentos - Contaminação. 3. Micotoxinas. 4. Aflatoxina - Análise. 5. Milho - Produtos - Indústria - Moçambique. 6. Segurança alimentar - Moçambique. 7. Avaliação de riscos de saúde. I. Menezes-Filho, José Antônio. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 664.76

CDU - 664.761

TERMO DE APROVAÇÃO

MARTINHO GAMAS DINIS MARTINHO

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 E G2 NA FARINHA DE MILHO PRODUZIDA EM NAMPULA, MOÇAMBIQUE, E SUA AVALIAÇÃO DE RISCO CARCINOGÊNICO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 29 de junho de 2023.

BANCA EXAMINADORA

 Documento assinado digitalmente
JOSE ANTONIO MENEZES FILHO
Data: 03/07/2023 16:42:08 -0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Dr. JOSÉ ANTÔNIO MENEZES FILHO (ORIENTADORA)
Universidade Federal da Bahia (UFBA, BA)

 Documento assinado digitalmente
IZABELA MIRANDA DE CASTRO
Data: 06/07/2023 14:05:46 -0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Drª. IZABELA MIRANDA DE CASTRO (EXAMINADORA)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, SP)

 Documento assinado digitalmente
LAISE CEDRAZ PINTO MATOS
Data: 03/07/2023 17:04:46 -0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Drª. LAISE CEDRAZ PINTO MATOS (EXAMINADORA)
Universidade Federal da Bahia (UFBA, BA)

Dedico este trabalho,

A Deus, pela vida.

À minha mãe, ao meu pai a toda minha família;

Aos meus filhos: Idalina, Marlina e Muhammed;

*À minha esposa: Carmelina Valentina da Costa,
e a todas pessoas que fizeram parte dessa caminhada*

Meus agradecimentos,

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida, saúde e pelas surpresas que me tem dado dia após dia, pela força e coragem nas horas mais agradáveis e difíceis que passei durante o mestrado, não deixando que desistisse diante das adversidades e dificuldades.

À Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida (nº do processo: 88887.690874/2022-00);

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PGAlí) da UFBA por ter me aceitado no programa e pelo apoio incondicional e em especial ao Prof. Dr. Ederlan, à Profa. Dra. Carol Souza e à Priscila pela motivação e colaboração que sempre demonstraram no decorrer deste percurso.

Gostaria também de salientar que existem pessoas sem as quais nada disto seria possível, pelos mais diversos motivos, como tudo o que me ensinaram, o apoio constante que me deram e as palavras amigas que me ajudaram no percurso que estou agora a terminar. Assim, não posso deixar de expressar aqui os meus sinceros agradecimentos:

Ao prof. Dr. José Antônio Menezes Filho, pelos ensinamentos e orientação ao longo do meu percurso acadêmico, pela disponibilidade, atenção, mas acima de tudo pela clareza de ideias e sugestões na elaboração desta dissertação, que me proporcionou imenso aprendizado.

A equipe de Labtox, no geral, a Luciene, Mária, um agradecimento pelos seus conhecimentos que me transmitiram ao longo desta caminhada que foram extremamente cruciais para a concretização deste sonho.

Ao Laboratório da Universidade Lúrio por ter aceito a conservação das amostras durante o processo de coleta de amostra em Moçambique.

Aos meus pais Martinho Amisse e Idalina Ernesto pela confiança e força que depositam em mim, aos meus irmãos, a minha esposa e filhos, aos meus sobrinhos pelo apoio prestado em todos os momentos e a todos os níveis.

Um simples obrigado não é suficiente para espelhar a minha alegria e gratidão para todos que direta ou indiretamente fizeram e ainda continuam fazendo por mim, mas como é a única palavra que agora tenho em mente, aí vai o meu *Khochukuro*.

RESUMO

Introdução: As aflatoxinas são compostos produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em países de clima quente e úmido. Estas podem contaminar cereais, incluindo o milho que é a base da dieta em países africanos, como Moçambique. Estas causam sérios problemas na saúde humana e animal. Na África Subsaariana, as estimativas de exposição dietética às AFs superam a 100 ng/kg pc/dia, enquanto que a incidência de câncer hepatocelular (CHC) é de 46.000 casos/ano. No capítulo I deste estudo, apresenta-se uma fundamentação teórica sobre a evolução do conceito de micotoxinas e, por final falou-se da Avaliação de risco carcinogénico. No capítulo II, apresenta-se o relatório da investigação da ocorrência desses contaminantes em farinha de milho produzida e comercializadas na cidade de Nampula, Moçambique e sua a avaliação do risco carcinogénico. **Objetivos:** Verificar a ocorrência das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ na farinha de milho produzida e comercializada em Nampula, Moçambique e avaliar o risco carcinogénico devido ao seu consumo. **Metodologia:** As amostras de farinha de milho (n=30), foram coletadas em cinco fábricas processadoras de farinha de milho localizadas em Nampula (Moçambique). A determinação de umidade das farinhas foi realizada segundo métodos oficiais proposto pelo Instituto Adolfo Lutz, e do teor de AFs por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência após extração em colunas de imunoafinidade e derivatização com ácido trifluoroacético. Para adaptação e validação da metodologia analítica fez-se necessário a realização de testes de linearidade, seletividade, sensibilidade (limite de detecção e de quantificação), precisão (coeficiente de variação em %) e exatidão (recuperação em %) como parâmetros de avaliação de desempenho do método. A ingestão diária de AFs pela população moçambicana foi estimada de acordo com o peso médio da população adulta e a estimativa de consumo *per capita* da farinha de milho. A avaliação de risco carcinogénico foi baseada no cálculo da Margem de Exposição (MOE) para dois cenários distintos: homens e mulheres. **Resultados e Discussão:** A média da umidade nas amostras coletadas foi 10,5% ± 0,79, variando de 9,1% a 12,2%. As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram detectadas em 20% das amostras (n=6), sendo que em 23,3% (n=7) delas tiveram contaminação de pelo menos duas ou três das aflatoxinas. Em 56,7% (n=17), das amostras não foram detectadas AFs. A contaminação por AFB₁ variou de 0,25 a 0,33 µg.kg⁻¹, e os teores de aflatoxinas totais variaram de 0,55 e 1,05 µg.kg⁻¹, com média de 0,89 µg.kg⁻¹ estando abaixo dos LMT (10 µg.kg⁻¹ e 4 µg.kg⁻¹) para grão de milho em Moçambique e União Europeia, respectivamente. A MOE calculada para homens foi de 243 e para mulheres de 231, estando, portanto, muitas vezes abaixo do ponto de corte de risco negligenciável que é 10.000. **Conclusões:** O consumo da farinha de milho em Moçambique

representa um elevado risco carcinogênico pela exposição às aflatoxinas, devido ao alto consumo deste produto alimentício que é a base da dieta na maioria dos países africanos.

Palavras-chave: Micotoxinas. Produtos a base de milho. Avaliação de risco. Moçambique. Segurança Alimentar.

ABSTRACT

Introduction: Aflatoxins (AFs) are compounds produced by the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in countries with hot and humid climates. They can contaminate cereals, including maize which is the staple diet in African countries such as Mozambique. These cause serious problems in human and animal health. In sub-Saharan Africa, estimates of dietary exposure to AFs exceed 100 ng/kg bw/day, while the incidence of hepatocellular cancer (HCC) is 46,000 cases/year. Chapter I of this study presents a theoretical background on the evolution of the concept of mycotoxins and, finally, discusses the carcinogenic risk assessment. In chapter II, it is presented the report of the investigation of the occurrence of these contaminants in maize flour produced and commercialized in the city of Nampula, Mozambique and its carcinogenic risk evaluation. **Objectives:** To verify the occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in maize flour produced and commercialized in Nampula, Mozambique and to evaluate the carcinogenic risk due to its consumption. **Methodology:** Maize flour samples (n=30), were collected from five maize flour processing plants located in Nampula (Mozambique). The determination of humidity of the flours was performed according to official methods proposed by the Adolfo Lutz Institute, and the content of AFs by High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detector after extraction in immunoaffinity columns and derivatization with trifluoroacetic acid. For adaptation and validation of the analytical methodology it was necessary to perform tests of linearity, selectivity, sensitivity (detection limit and quantification limit), precision (coefficient of variation in %) and accuracy (recovery in %) as parameters to evaluate the method performance. The daily intake of AFs by the Mozambican population was estimated according to the average weight of the adult population and the estimated per capita consumption of maize flour. The carcinogenic risk assessment was based on the calculation of the Margin of Exposure (MOE) for two distinct scenarios: men and women. **Results and Discussion:** The mean moisture content of the collected samples was 10.5% ± 0.79, ranging from 9.1% to 12.2%. Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ were detected in 20% of the samples (n=6), and in 23.3% (n=7) of them had contamination of at least two or three of the aflatoxins. In 56.7% (n=17), of the samples no AFs were detected. AFB₁ contamination ranged from 0.25 to 0.33 µg.kg⁻¹, and total aflatoxin contents ranged from 0.55 and 1.05 µg.kg⁻¹, with a mean of 0.89 µg.kg⁻¹ being below the MRLs (10 µg.kg⁻¹ and 4 µg.kg⁻¹) for maize grain in Mozambique and the European Union, respectively. The calculated MOE for males was 243 and for females 231, thus being many times below the negligible risk cutoff point of 10,000. **Conclusions:** The consumption of maize flour in Mozambique poses a high carcinogenic risk by exposure to

aflatoxins, due to the high consumption of this food product that is the basis of the diet in most African countries.

Keywords: Mycotoxins. Maize products. Risk assessment. Mozambique. Food security.

LISTA DE FIGURAS

<i>CAPÍTULO I</i>	15
Figura 1 Reação de derivatização da Aflatoxina G ₁ e aflatoxina B ₁ com TFA (ácido trifluoroacético)	22
Figura 2 Quadro 1. Características físico-químicas das Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ e M ₂	23
Figura 3 Esquema do processo de metabolismo de aflatoxinas B ₁ e formação dos seus compostos bioativos e suas principais isoenzimas que atuam no processo.....	26
Figura 4 Mapa de localização geográfica de Moçambique e sua divisão administrativa	35
Figura 5 Princípio de funcionamento de uma coluna de imunoafinidade e o processo de eluição	44
 <i>CAPÍTULO II</i>	 57
Figura 1 Mapeamento dos locais de coleta de amostra de farinha de milho utilizada para o estudo. Nampula-Moçambique	63
Figura 2 Cromatogramas das aflatoxinas na farinha de milho: (a) amostra fortificada com 19,76 µg.kg ⁻¹ do mix de AFs e (b) amostra naturalmente contaminada.....	73
Figura 3 Curvas de calibração de padrão mix de aflatoxinas (G ₁ , B ₁ , G ₂ e B ₂) derivatizadas.....	74
Figura 4 Descrição da Margem de exposição a aflatoxinas totais devido ao consumo da farinha de milho para homens e mulheres.....	78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I.....	15
Tabela 1 Relação entre a ingestão de aflatoxina B1 excluídas outras causas, e a incidência de câncer hepatocelular em países da África e Asia.....	29
Tabela 2 Limite máximo permitido para aflatoxina em alimentos para consumo humano em vários países do mundo.....	30
Tabela 3 Principais estudos sobre aflatoxinas no milho e seus derivados em Moçambique.....	33
Tabela 4 Produção de Alimentos básicos de alguns países da África austral que fazem fronteira com Moçambique, período de 2015-2020.....	37
Tabela 5 Ocorrência de aflatoxinas no Mundo em diferentes matrizes incluindo o grão de milho e em seus derivados assim como os métodos analíticos.....	38
 CAPÍTULO II.....	 57
Tabela 1 Teor de Umidade encontrado para cada momento de coleta de farinha de milho nas Indústria.....	69
Tabela 2 Resultados quantitativos da validação analítica do método para determinação da contaminação em aflatoxinas G1, B1, G2 e B2 na farinha demilho.....	71
Tabela 3 Tempo de retenção das aflatoxinas em amostras de farinha fortificada e naturalmente contaminada.....	72
Tabela 4 Determinação da sensibilidade do método através do método da razão Sinal-Ruído.....	74
Tabela 5 Ocorrência de aflatoxinas em todas amostras de farinha de milho selecionada	75
Tabela 6 Descrição dos dados da ingestão de aflatoxinas totais para o consumo de farinha de milho, por homens e mulheres.....	78

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO I – Ocorrência de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ na Farinha de Milho produzida em Nampula, Moçambique, e sua Avaliação de Risco Carcinogênico</i>	15
1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 MICOTOXINAS	20
3.2.1 Contexto histórico e evolução do conceito de micotoxinas	20
3.2 Aflatoxinas	21
3.2.1 Características físico-químicas das Aflatoxinas	23
3.2.2 Aspectos da toxicocinética da Aflatoxina	24
3.3 Aspectos toxicológicos das Aflatoxinas	27
3.3.1 Carcinogenicidade para a Espécie Humana	28
3.4 Ocorrência de Aflatoxinas em alimentos	32
3.5 Descrição das regiões de estudos e da produção de milho em Moçambique e na África	34
3.6 Aflatoxinas no Milho	36
3.7 Avaliação de risco	45
Referências	47

<u>CAPÍTULO II – OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ E G₂ NA</u>	
<u>FARINHA DE MILHO PRODUZIDA EM NAMPULA, MOÇAMBIQUE, E SUA</u>	
<u>AValiação DE RISCO CARCINOgÊNICO</u>	57

Capítulo I

Ocorrência de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ na Farinha de Milho produzida em Nampula, Moçambique, e sua Avaliação de Risco Carcinogênico

1 INTRODUÇÃO

As aflatoxinas (AFs) são compostos de bisfuranocumarinas produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, em países de clima quente e úmido. São reconhecidos como sendo promotoras de efeitos deletérios à saúde humana e animal (EFSA, 2019; VILLERS, 2014), como efeitos mutagênicas e carcinogênicas (WILLIAM *et al.*, 2004). Assim, a contaminação de alimentos por estas substâncias é um grave problema de saúde pública (ROCHA *et al.*, 2023).

Na África Subsaariana (ASS), estimativa de exposição dietética às aflatoxinas superam a 100 ng/kg pc/dia (WHO, 2018). Assim, na ASS tem uma incidência de câncer hepatocelular (CHC) de 46.000 casos/ano, com ocorrências padronizadas por idade de até 41,2/100.000 a cada ano (El-KASSAS; ELBADRY, 2022). A incidência de câncer hepatocelular (CHC) em Moçambique relacionada a ingestão de AFB₁ e excluídas outras causas foi de 17,7 casos/100,000 habitantes, sendo considerada a maior taxa de CHC do mundo e afeta mais homens do que mulheres (WHO, 2018; El-KASSAS; ELBADRY, 2022).

A presença de AFs nos alimentos ocorre predominantemente em regiões com climas tropicais e subtropicais (DUARTE *et al.*, 2014), como é o caso de Moçambique. Existem duas formas de inserção das aflatoxinas nas cadeias alimentares: uma por contaminação direta, quando o fungo toxicógeno contamina o produto e, em sequência, sintetiza a micotoxina e ambos permanecem no produto; e por contaminação indireta, em que a micotoxina estará presente no produto final resultante de contaminação fúngica prévia, porém o fungo foi eliminado no processamento (XIULAN, 2005).

Em Moçambique, e especialmente na cidade de Nampula, poucas são as pesquisas feitas referentes à ocorrência de Aflatoxinas em produtos derivados do milho que se destinam ao consumo humano. Apesar de haver relatórios de pesquisas feitas entre 1980 e 2018 que quantificaram aflatoxinas no grão de milho e dietas alimentares, existem divergências entre os estudos desenvolvidos no que diz respeito a forma como os dados foram coletados e analisados. A maioria destes estudos não faz a distinção do tipo de aflatoxinas detectadas e os resultados são apresentados em média e mediana (CASADEI, 1980; VAN RENSBURG *et al.*, 1985; WARTH *et al.*, 2012; AUGUSTO *et al.*, 2014; CAMBAZA *et al.*, 2018).

Os métodos analíticos comumente utilizados na determinação de AFs encontram-se disponíveis em vários laboratórios de alimentos e rações de diferentes instituições ou entidades, dentre eles a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (WACOO *et al.*, 2014; TAO *et al.*, 2018;).

Por outro lado, para realizar uma avaliação de risco inclui quatro fases, nomeadamente: a identificação do perigo, a caracterização do perigo, a avaliação da exposição e a caracterização do risco (JARDIM; CALDAS, 2009). Tratando-se de identificação e quantificação de AFs B₁, a caracterização do risco pode ser feita através da caracterização da Margem de exposição (MOE), a depender das características toxicológicas da su Assim, além da determinação, uma outra forma de se avaliar a exposição das populações às AFs é por meioA caracterização do risco através da Margem de Exposição (MOE). A MOE é a razão entre o limite de confiança inferior da dose de referência (BMDL) e estimativa diária de consumo/exposição humana a essa substância (JARDIM; CALDAS, 2009). Esta medida, ajuda a determinar o nível de preocupação, onde valores da MOE inferiores a 10.000 indicam que há um risco na ótica de saúde pública e a estabelecer prioridades para tomadas de medidas de gestão de risco (ESPOSITO *et al.*, 2017; EFSA, 2020).

Esta pesquisa visa analisar a ocorrência das aflatoxinas B₁, G₁, G₂ e B₂, e proceder uma avaliação de risco carcinogénico pela exposição devido ao consumo da farinha de milho pela população moçambicana. Este é o primeiro estudo em Moçambique que avalia na farinha de milho, a ocorrência das aflatoxinas (B₁, G₁, G₂ e B₂) e faz a avaliação do risco carcinogénico devido ao consumo da farinha de milho contaminada por aflatoxinas. O resultado deste estudo pode contribuir para as autoridades moçambicanas na criação de legislação específicas para aflatoxinas e despertar o interesse no controle destes contaminantes em alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Determinar os teores de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em amostras de farinha de milho produzida na cidade de Nampula, Moçambique e realizar a avaliação do risco carcinogénico para o consumo desta farinha.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Descrever as condições do manejo do grão de milho antes e depois do processamento do grão;
- ✓ Determinar a umidade das amostras de farinha de milho selecionadas;
- ✓ Detectar e quantificar as aflatoxinas presentes nas amostras de farinha de milho selecionadas;
- ✓ Comparar os teores de aflatoxinas com o momento de coleta das amostras nas diferentes processadoras;
- ✓ Estimar a ingestão diária de AFs pelo consumo de farinha de milho pela população moçambicana;
- ✓ Caracterizar o risco carcinogénico em decorrência à exposição das AFs pelo consumo da farinha de milho;
- ✓ Fornecer subsídio para regulamentação dos teores de aflatoxinas nesse produto.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 MICOTOXINAS

3.1.1 Contexto histórico e evolução do conceito de micotoxinas

A palavra micotoxinas, deriva da aglutinação de dois termos, o termo grego, *Mykes*, que significa fungos e do termo latim, *Toxicum*, que significa toxina (MEDEIROS *et al.*, 2012). Assim, a tradução literária de micotoxinas corresponde a substâncias tóxicas produzidas por fungos. Saleh e Goktep (2019) definem as micotoxinas como metabólitos secundários produzidos por várias estirpes de fungos, podendo afetar os seres humanos, principalmente através da ingestão de alimentos contaminados. Vários fatores como as condições climáticas favoráveis, práticas agrícolas inadequadas, armazenamento inadequado, danos físicos da própria cultura e variações sazonais contribuem para incidência das micotoxinas em culturas alimentares (WARTH *et al.*, 2012).

Os primeiros relatos sobre micotoxinas na história decorrem no século X, onde uma doença de etiologia desconhecida até o momento afetou um número considerável da população Europeia, em 943. As pessoas que sofriam da doença apresentavam sinais clínicos característicos, entre os quais, crise epilética, espuma na boca, vômitos, crises de loucura e dor insuportável. A doença foi designada popularmente por “Fogo de Santo Antônio”, pois os enfermos relatavam que se tratava de um fogo invisível que desprendia o músculo dos ossos e os consumia, e ao ter as manifestações recorriam ao santuário de Santo Antônio, localizado na França, com o intuito de obterem a cura (FAO, 2003).

Atualmente sabe-se que o “Fogo de Santo Antônio” ou “Ergotismo” foi resultado de uma intoxicação alimentar pela ingestão de centeio contaminado por uma substância tóxica produzida pelo fungo *Claviceps purpurea* (FAO, 2003). Estas substâncias tóxicas são provenientes do metabolismo secundário de fungos filamentosos e contaminam naturalmente os produtos agrícolas alimentares (SOARES *et al.*, 2022). Assim, os metabólitos secundários produzidos por esses fungos são denominados por micotoxinas e as doenças causadas pela sua ingestão por micotoxicose (SANTOS, 2018). Algumas micotoxinas, como a patulina são conhecidas há bastante tempo, desde a década de 40. No entanto, somente a partir de 1960 os estudos sobre atividades destas substâncias foram intensificadas em consequência de um surto que matou mais de 100.000 perus na Inglaterra e, uma vez que não se conhecia as causas responsáveis pela enfermidade, ficou conhecida como a “*Turkey X disease*” (ROCHA *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2022).

Na sequência, investigações feitas por “Tropical Product” identificaram a causa da morte dos perus devido à ingestão de ração à base de amendoim proveniente do Brasil e África. A substância presente nessa ração era fluorescente e proveniente do fungo *Aspergillus flavus*.

Surgia, então, a primeira micotoxina a ser estudada: a Aflatoxina, derivada da expressão inglesa *Aspergillus flavus* toxins (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Atualmente, mais de 500 micotoxinas diferentes já foram reportadas na literatura (MEDEIROS *et al.*, 2012). Segundo Autoridade de Segurança Alimentar e Económica em Portugal (SAI, 2015), as micotoxinas são compostos orgânicos, de baixo peso molecular (~700 g/mol), quimicamente estáveis e altamente resistentes aos métodos de processamento utilizados na indústria alimentar. Sendo um contaminante natural, especialmente nos vegetais, torna-se impossível a sua eliminação. Assim, é extremamente imperioso minimizar a contaminação dos alimentos por fungos para que estes não representem um risco para a saúde da população (SANTOS, 2018).

3.2 Aflatoxinas

As AFs são compostos de bisfuranocumarinas produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, em países de clima quente e úmido e são reconhecidos como grandes causadores de problemas sérios a saúde humana e animal (VILLERS, 2014; EFSA, 2019). Atualmente, estão descritos cerca de 18 tipos de aflatoxinas, sendo que as principais identificadas como: B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂ (COLL *et al.*, 2015). As letras representam o tipo de fluorescência que emitem quando são submetidas à luz ultravioleta: B (*blue* – azul) ou G (*green* – verde), e os índices 1 (um) e 2 (dois) referem-se à sua mobilidade na coluna cromatográfica e, a AFM₁ e M₂ emitem fluorescência azul-violeta (ROCHA *et al.*, 2014).

Atualmente, estão descritas cerca de 18 tipos de aflatoxinas, sendo que as principais classificadas como: B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂ (COLL *et al.*, 2015), as quais as letras representam o tipo de fluorescência que emitem quando são submetidas à luz ultravioleta: B (*blue* – azul) ou G (*green* – verde) e, a AFM₁ e M₂ emitem fluorescência azul-violeta. Os índices 1 (um) e 2 (dois) referem-se à sua mobilidade na coluna cromatográfica e (ROCHA *et al.*, 2014).

A Aflatoxina B₁ é a micotoxina mais tóxica, mais abundante, e é um dos compostos naturais mais carcinogénicos em todas as espécies animais pesquisadas. A *Internacional Agency for Research on Cancer* (IARC) classifica a AFB₁ como composto do “Grupo I”. Quando há exposição à AFB₁, os seus metabólitos ativados ligam-se ao ácido desoxirribonucleico (ADN) e interferem na síntese de proteína apresentam acção genotóxica e imunossupressora (COLL *et al.*, 2015; TATTIBAYEVA, 2017).

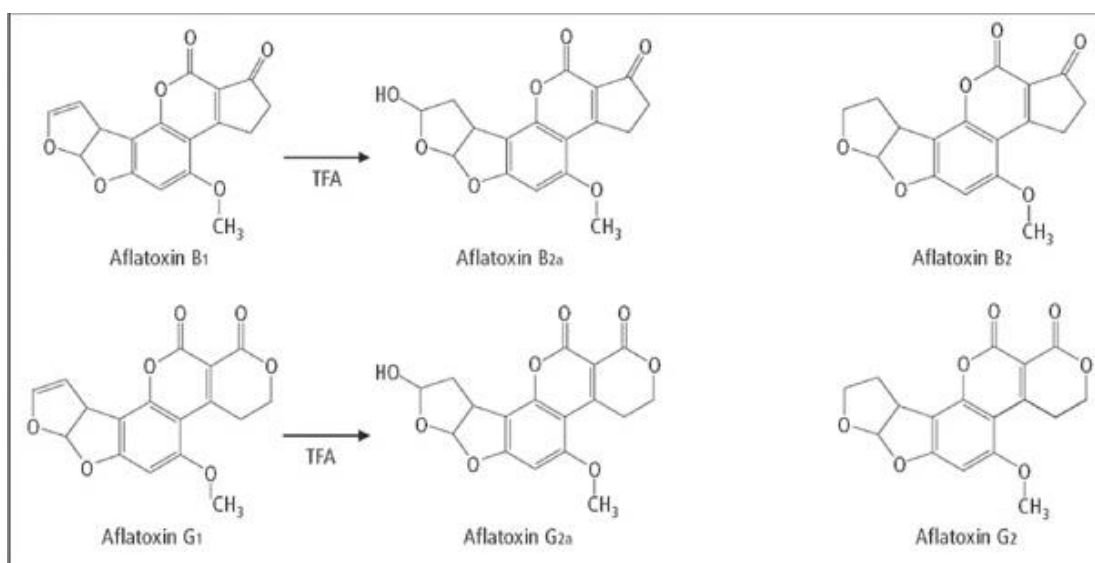
A micotoxina produzida pelo fungo *A. flavus* encontra-se adaptada a maiores variedades de climas, substratos e *habitats*. Este produz somente as aflatoxinas do tipo B₁ e B₂, e os principais alimentos onde são encontrados majoritariamente são: amendoim, milho e sementes de algodão. *A. parasiticus* privilegia o solo e possui uma distribuição mais limitada

que *A. flavus*, todas as estirpes produzem aflatoxinas Bs e Gs e, o gênero é, sobretudo, encontrado no amendoim (EFSA, 2019; SOARES, 2022).

As AFs B₁, B₂, G₁ e G₂ são naturalmente fluorescentes, entretanto, AFB₁ e AFB₂ apresentam intensidade discreta e o uso de solventes como metanol, água e acetonitrila diminuem a intensidade da emissão do sinal. Para obter menores limites de detecção e aumentar o sinal, é usual realizar uma reação de derivatização, com o objetivo de agregar ao analito um radical fluorescente, facilitando sua detecção. Na reação de derivatização ocorre a adição de um grupo fluoróforo adequado na molécula de aflatoxina (JAIMEZ *et al.*, 2000; ARROYO-MANZANARES *et al.*, 2015; GODOY, 2018).

O ácido trifluoroacético (TFA) é bastante utilizado para a derivatização pré-coluna de aflatoxinas na análise por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) com detetor de fluorescência. As ligações duplas nas posições diidrofurano das aflatoxinas B₁ e G₁ (figura 1), em solução ácida são rapidamente hidratadas com consequente produção das espécies B_{2a} e G_{2a}, respectivamente. A reação de derivatização pré-coluna aumenta a intensidade de fluorescência das novas espécies produzidas e as tornam mais polares que as espécies primárias, por outro lado, derivatização pré-coluna tem sido bastante usada e empregada em cromatografia de fase reversa (KOK, 1994). Neste trabalho, sobretudo no manuscrito contido no Capítulo II, os derivados hemiacetáis das aflatoxinas serão tratados como B₁ e G₁ para fins de simplificação.

Figura 1 – Reacção de derivatização da Aflatoxina B₁ e aflatoxina G₁ com ácido trifluoroacético (TFA)



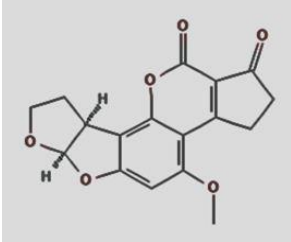
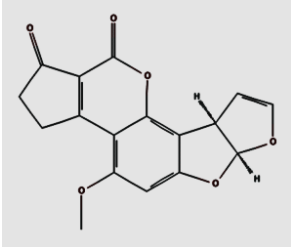
Fonte: Retirado da página de *Monolithic Chromatography Columns* (<http://www.chromatographyonline.com>)

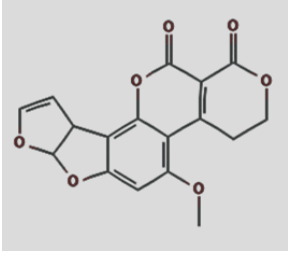
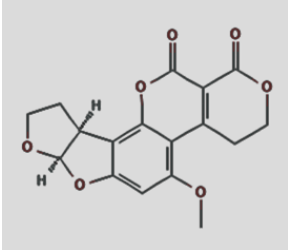
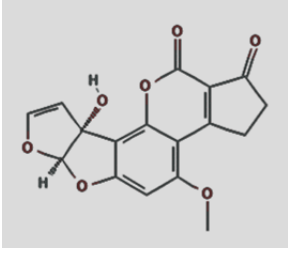
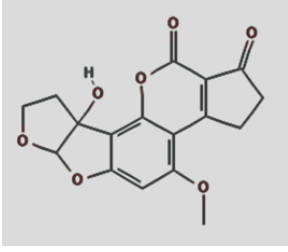
3.2.1 Características físico-químicas das Aflatoxinas

As AFs são cristais incolores a amarelo claro, no entanto, apresentam intensa fluorescência quando submetidas a luz ultravioleta, são instáveis à luz ultravioleta na presença de oxigênio, em condições de pH extremo (< 3 ou > 10) e na presença de agentes oxidantes, porém, são estáveis a temperaturas acima de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TURNER *et al.*, 2009; EFSA, 2019).

Na molécula de AFs, a presença da dupla ligação do éter de vinil C8=C9 no anel furano terminal das AFB₁ e AFG₁, as torna com maior potencial carcinogênico, genotóxico e imunossupressor quando comparadas com as AFB₂ e AFG₂ (JAIMEZ *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 2017). As AFs são substâncias lipofílicas e de baixo peso molecular, insolúveis em solventes polares, porém, são solúveis em solventes apolares e ligeiramente polares, como a clorofórmio, metanol, benzeno, acetonitrilo, entre outros (SANTOS, 2018; EFSA, 2019). A solubilidade na água é de $10 - 30\text{ }\mu\text{g/mL}$ (IARC, 2012). Em seguida, na figura 2, estão representadas algumas características físico-químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂. As aflatoxinas M₁ e M₂ são produzidas por hidroxilação das aflatoxinas B₁ e G₁ respectivamente (UENG *et al.*, 1995). Estas últimas podem ser transferidas para os lactantes através do processo de amamentação.

Quadro 1 – Características físico-químicas das Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂

Nome da Aflatoxina	Formula Química	Peso Molecular	Estrutura Química	Ponto de Fusão ($^{\circ}\text{C}$)
AFB ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,3 g/mol		268-269
AFB ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,3 g/mol		286-289

AFG ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3 g/mol		244-246
AFG ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3 g/mol		237-240
AFM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3 g/mol		299
AFM ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3 g/mol		293

Fonte: Adaptado de EFSA (2019); Amoras e Costa (2021).

3.2.2 Aspectos da toxicocinética da Aflatoxina

Devido aos seus efeitos a curto e longo prazo tanto no organismo humano assim como animal, torna-se importante o conhecimento da toxicocinética das micotoxinas de modo a compreender a sua toxicidade. (DUARTE *et al.*, 2014). Porém, até o presente poucas são as pesquisas relativas ao processo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção das micotoxinas.

3.2.2.1 Absorção

Relativamente à absorção em seres humanos, devido à lipossolubilidade das aflatoxinas, a absorção ocorre rapidamente no trato gastrintestinal e é rapidamente convertida no fígado pelas enzimas microssômicas oxidases mistas (EFSA, 2007). Sobre a toxicocinética das micotoxinas, Jubert *et al.* (2009) realizaram um estudo em 3 indivíduos do sexo masculino através da exposição por via oral de doses baixas de AFB₁ ligada a ¹⁴C. Esta pesquisa

evidenciou uma rápida absorção de AFs pelo trato-gastrintestinal, mais tarde 95% da radioatividade foi eliminada por via urinária após 24 horas seguintes a exposição.

3.2.2.2 Distribuição

De acordo com estudo desenvolvido pela EFSA (2019), o fígado é o principal órgão afetado pelas aflatoxinas devido a uma maior acumulação de AFB₁, podendo causar cirrose e câncer hepatocelular. Por outro lado, a exposição do feto às aflatoxinas pode ocorrer por meio placentário da mãe para filho.

3.2.2.3 Metabolismo

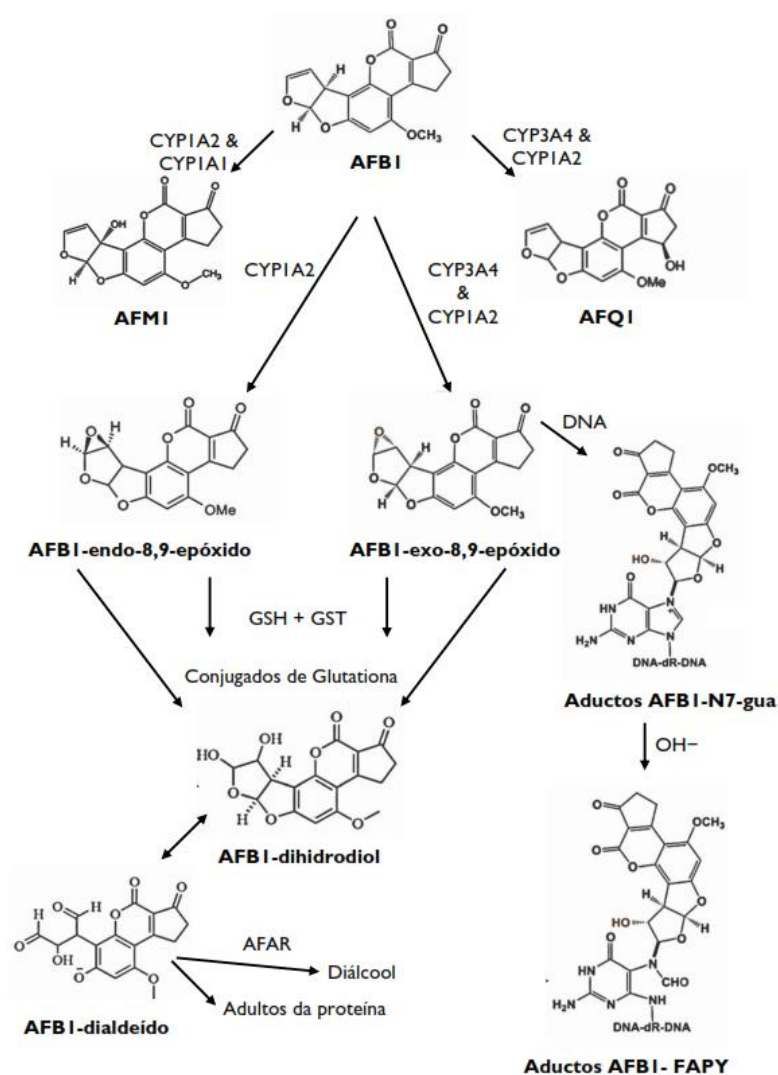
A biotransformação das AFs ocorre majoritariamente no fígado, mediadas pela ação de conjunto de enzimas microsossomiais de citocromo P450 (CYP450), entre elas CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5 e CYP3A7 localizadas no fígado e CYP2A13 no pulmão (RANEY *et al.*, 1992). Entretanto, ocorre a biotransformação de AFB₁ em 2 (dois) isômeros de AFB₁ – 8,9 – epóxido (AFBO), o endo – 8,9 – epóxido e o exo – 8,9 – epóxido (HABIBI *et al.*, 2019). Assim, o isômero AFB₁ exo – 8,9 – epóxido é altamente potente e de maior expressão, a Figura 3 ilustra as principais isoenzimas que atuam neste processo metabólico no fígado (RANEY *et al.*, 1992; RUSHING; SELIM, 2019). A conversão de AFB₁ em AFBO é mediada principalmente por CYP3A4 quando a concentração de AFB₁ é alta, produzindo-se essencialmente exo-8,9-epóxido (UENG *et al.*, 1995). Por outro lado, em situações de baixas concentrações sorológicas, o isoenzima CYP1A2 passa a ser o principal responsável pela produção de AFBO. Entretanto, as aflatoxinas M₁ e Q₁ são produzidas por CYP3A4 e CYP1A2 respectivamente (UENG *et al.*, 1995). Segundo estudo desenvolvido por Pottenger *et al.* (2014), a via de detoxificação de epóxidos de aflatoxinas ocorre através da reação destas com glutatona (GSH) desencadeada por glutatona s-transferase (GST) assim como a sua redução a álcoois.

As aflatoxinas bioativadas pelo sistema enzimático microsossomial, reage com locais nucleofílicos, entre elas, S, N e O do ADN e proteínas (EFSA, 2019). Entretanto, com a ligação de AFBO e resíduos de guanina no ADN, levam a formação de AFB₁-N7-guanina (AFB₁-N7-gua). Este último composto, converte-se em enantiômeros da formamidopirimidina (Aflatoxina B₁ – alta Formamidopirimidina e Aflatoxina B₁ – beta – formamidopirimidina (AFB₁ – α – FAFY e AFB₁ – β – FAPY), porém, AFB₁ – β – FAPY pode causar maiores danos ao nível genotóxico (HABIBI *et al.*, 2019).

Em humanos, a exposição a AFB₁ pode ser monitorizada através de doseamento dos aductos AFB₁-N7-gua diretamente na urina ou no sangue periférico, e ou através dos aductos AFB₁-albumina (MONTESANO *et al.*, 1997; SASS *et al.*, 2013).

Por outro lado, a AFB₁ pode também ser metabolizada em produtos hidroxilados, entre os quais, a aflatoxina M₁ (AFM₁), aflatoxina Q₁ (AFQ₁), aflatoxina P₁ (AFP₁), aflatoxicol (AFL), aflatoxicol H1 (AFH1) e aflatoxina B_{2a} (AFB_{2a}) (RUSHING; SELIM, 2018; EFSA, 2019). AFQ₁ e AFM₁, assim como a AFP₁ são principais produtos de desintoxicação, sendo este último formado pela desmetilação (EFSA, 2019).

Figura 3 – Processo de metabolismo da Aflatoxina B₁ e formação dos seus compostos bioativos e suas principais isoenzimas que atuam no processo.



Fonte: Adaptado de Raney et al., (1992); Habibe et al. (2019); Rushing e Selim, (2019)

3.3 Aspectos toxicológicos das Aflatoxinas

Segundo William *et al.* (2004) as AFs estão entre as substâncias potencialmente conhecidas pelo homem como sendo mutagênicas e carcinogênicas tanto para saúde humana, assim como para o animal. Aflatoxicose é uma intoxicação causada por Aflatoxinas B₁ e, apresenta-se como aguda ou crônica. Os efeitos agudos ocorrem quando há alto nível de exposição em um curto intervalo de tempo, e crônicos, quando ocorre exposição em pequenas doses e durante um longo intervalo de tempo.

Em humanos, se a exposição a AFB₁ ocorrer em curto prazo, e uma ingestão de níveis elevados de contaminação (na ordem dos ppm), o AF-8,9-epóxido rapidamente liga-se às proteínas do fígado, e consequentemente ocorre uma aflatoxicose aguda podendo também causar nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e hepatotoxicidade, resultando em quadro clínico de icterícia, vômito, dores abdominais e insuficiência hepática, que pode levar à morte (MIDIO; MARTINS, 2000; OGODO; UGBOGU, 2016; EFSA, 2019). Esta se apresenta também com características semelhantes com a Síndrome de Reye, um tipo de encefalopatia que surge em crianças. Esta última se caracteriza por vômitos, hipoglicemia, convulsões, hiperamonemia, coma, e outros sintomas agudos tal como citados acima (ASAE, 2009).

Os efeitos crônicos relacionam-se com quadros de desnutrição, carcinogênese e imunossupressão (com implicações sérias em zonas com prevalência de HIV/SIDA como é o caso de Moçambique). Afeta o número de linfócitos e inibem a fagocitose. Em pacientes que apresentam infecção pelo vírus de hepatite B, o risco em desenvolver o câncer hepático aumenta 60 vezes, uma vez que a aflatoxina B₁ torna-se 30 vezes mais potente nestes indivíduos (COLL, 2015). Aflatoxina-8,9-epóxido ao ligar-se ao ADN pode induzir a aparecimento de doenças hepáticas, tais como, o carcinoma hepatocelular (CHC), definido como câncer do fígado primário, cirrose, entre outras (MIDIO; MARTINS, 2000; OGODO; UGBOGU, 2016; EFSA, 2019). Além disso, pesquisas mostram que as aflatoxinas possuem elevado potencial tóxico, podendo atuar de forma neurotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica, carcinogênica e mutagênica (ALMEIDA-SOUSA, 2018; CESARTONDO, 2020).

Pesquisas mostram que os adultos tem maior tolerância do que as crianças na exposição aguda. Suspeita-se que o consumo de alimentos que contém concentrações de aflatoxinas iguais ou superiores a 1 mg/kg causam aflatoxicoses. Com base nos dados de surtos anteriores, foi estimado que as doses de 20-120 µg.kg⁻¹/dia de AFB₁ durante períodos de 1 a 3 semanas produzem toxicidade aguda, potencialmente mortal (WHO, 2018). Por outro lado, a condição de vulnerabilidade nutricional e o de déficit nutricional agrava ainda mais a toxicidade.

“[...] O combate à má nutrição nas crianças menores de cinco anos é uma prioridade política para Moçambique [...]”. De acordo com o último Inquérito Demográfico e de Saúde (2011), a prevalência nacional de desnutrição crônica (baixa estatura para a idade) é de 43% em crianças menores de cinco anos. Houve pouca mudança nos níveis de desnutrição crônica registrados nas décadas anteriores, com taxas de 49% em 1997, 50% em 2001, 47% em 2003 e 44% em 2008 (USAID *et al.*, 2019).

Foi mostrado em vários países de baixa renda como Moçambique, que a pobreza está relacionada a dietas de baixa qualidade e que a baixa qualidade da dieta está intimamente associada à desnutrição. A qualidade da dieta envolve calorias adequadas e uma diversidade de nutrientes, mas também exige que os alimentos estejam protegidos de todas as formas de toxinas (WEBB, 2018).

3.3.1 Carcinogenicidade para Humanos

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer de Brasil (INCA, 2022), o câncer de fígado pode ser dividido em dois tipos principais: o câncer primário e câncer secundário. O primeiro tem sua origem no próprio fígado, já secundário ou metastático que tem sua origem em outros órgãos e com o processo de evolução afeta o fígado. Diferentes tipos de células compõem o fígado, por isso vários tipos de neoplasias malignas e benignas podem se formar neste órgão. Estes tumores têm diferentes causas e, são tratados diferentemente e tem um prognóstico também diferente.

3.3.1.1 Epidemiologia e fatores de risco

O câncer de fígado é mais frequente em países da África e do Sudeste Asiático. A estimativa mundial aponta que mais de 800.000 pessoas são diagnosticadas com câncer de fígado a cada ano e é responsável por mais de 700.000 mortes por ano (ONCOGUIA, 2023). No Brasil, o número de mortes foram estimados em 10.763, sendo 6.093 homens e 4.670 mulheres (2020 - Atlas de Mortalidade por Câncer - SIM). E estimativas de novos casos foram de 10.700, sendo 6.390 em homens e 4.310 em mulheres (INCA, 2022). Evidências indicam que o carcinoma hepatocelular (CHC) é multifatorial em sua origem. A característica mais marcante segundo os autores em relação à epidemiologia é a variação geográfica da incidência dessa neoplasia.

São apontados como fatores de risco para os câncer hepatocelular pacientes que apresentam cirrose hepática, doença grave associada ao alcoolismo ou a infecção pelos vírus da hepatite B, excesso de gordura corporal (sobrepeso e obesidade), mas também ingestão de grãos e cereais quando contaminados por aflatoxinas (INCA, 2022).

Entre os países com maior incidência, destacam-se Moçambique, Zimbabwe, Etiópia, China (costa sudoeste) e Taiwan, alguns dos quais estão apresentados na Tabela 1. As diferenças extremas observadas na incidência do CHC entre os diversos países sugerem o envolvimento de fatores ambientais em sua etiologia. Dentre os fatores identificados, os que apresentam maior importância são as aflatoxinas e o vírus da hepatite B (PARKIN *et al.*, 1984).

Tabela 1 – Relação entre a ingestão de Aflatoxinas B₁ excluindo outras causas, e a incidência de câncer hepatocelular, em países da África e Ásia

País	Ingestão de AFB₁ ($\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1} \text{ pc} / \text{dia}$)	Incidência de CHC e (casos/100.000 habitantes/ano)
Quênia	3,5	1,2
	5,9	2,5
	10,0	4,0
Moçambique	20,3	5,9
	38,6	5,0
	77,7	12,1
	86,9	9,0
	87,7	15,5
	131,4	17,7
	183,7	14,0
China	21,0	175,4
	157,0	182,2
	1.232,0	288,5
	3.545,0	613,5

Fonte: Adaptado de Oliveira (1997, p. 421).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as estimativas nacionais da exposição dietética em aflatoxinas indicam que existem diferenças entre os países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento. Para os primeiros, a exposição dietética média é geralmente inferior a 0,001 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{dia}$, mas para alguns países da ASS as estimativas superam os 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{dia}$, apesar de basearem-se em poucos dados (WHO, 2018). Assim, na ASS tem uma incidência de câncer hepatocelular (CHC) de 46.000 casos/ ano, com ocorrências

padronizadas por idade de até 41,2 casos/100.000 a cada ano (El-KASSAS; ELBADRY, 2022). A incidência de câncer hepatocelular (CHC) em Moçambique relacionada a ingestão de AFB₁ e excluídas outras causas foi de 17,7 casos/100,000 habitantes, sendo considerada maior taxa de CHC do mundo e afeta mais homens do que mulheres (WHO 2018; El-KASSAS; ELBADRY, 2022). Em 2016, na estação de verão houve registo de mortes na República Unida da Tanzânia (país vizinho de Moçambique, ao norte) atribuídas a aflatoxinas (WHO, 2018).

Pelas sérias implicações para a saúde humana e animal atribuídas à presença de micotoxinas em grãos e outros gêneros alimentícios, muitos países já elaboraram legislações estipulando as quantidades máximas de micotoxinas permissíveis em alimentos e rações. A Tabela 2 apresenta os limites máximos para aflatoxinas permitidos em alimentos para consumo humano em vários países.

Tabela 2 – Limite máximo permitido para aflatoxina em alimentos para consumo humano em vários países do mundo

País	Limite máximo ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Alimento
União Europeia	2 (AFB ₁); 4 (AFT)	Cereais e produtos processados
Austrália	5 (AFT)	Todos alimentos
Brasil	20 (AFT)	Amendoim e derivados de milho
Índia	30 (AFT)	Todos alimentos
Japão	10 (AFT)	Todos alimentos
Singapura	0	Todos alimentos
África do Sul	5 (AFB ₁) 10 (AFT)	Todos alimentos
Suécia	5 (AFT)	Todos alimentos
Estados Unidos	20 (AFT)	Todos alimentos
Alemanha	2 (AFB ₁); 4 (AFT); 0,05 (AFT)	Todos alimentos Alimentos infantis

Fonte: (ANVISA, 2022; UE, 2023; <http://www.micotoxinas.com.br>)

Como pode ser visto na Tabela 2, não existe a nível mundial uma harmonização dos teores máximos permitidos de aflatoxinas nos alimentos. Os Estados Unidos da América, apresentam um limite de 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxinas totais em alimentos, na União Europeia é de 2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para a aflatoxina B₁ e 4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para aflatoxinas totais, para cereais e produtos processados (UE, 2023). A legislação brasileira, através do Ministério da Saúde, Instrução Normativa – IN Nº

160 de 1 de julho de 2022, estabelece o limite máximo de 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para aflatoxinas totais (B1+B2+G1+G2) em cereais e outros alimentos (BRASIL, 2022).

Pesquisas feitas em Moçambique entre 1980 a 2018 quantificaram aflatoxinas em vários tipos de amostras, porém, há divergências entre os estudos devido, sobretudo, quanto a forma de coleta e métodos analíticos. A maioria destes estudos não realizou a distinção entre os tipos de aflatoxinas detectadas (CASADEI, 1980; VAN RENSBURG *et al.*, 1985; AUGUSTO *et al.*, 2014; CAMBAZA *et al.*, 2018). Moçambique faz parte dos 15 países africanos que em 2003 apresentaram regulamentos específicos para micotoxinas, publicados pela *Food and Agricultural Organization* (FAO). Assim, a nível nacional, o limite máximo aceitável para aflatoxinas totais no milho e amendoim destinados ao consumo humano é de 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (FAO, 2003).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (em Inglês: IARC) considera a aflatoxina B₁ como micotoxina com maior potencial tóxico e foi classificada como pertencente ao grupo I que corresponde aos compostos que são carcinogênicos para humanos (IARC, 2012). Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação causa-efeito entre exposição a AFB₁ e o aumento do risco de desenvolver carcinoma hepatocelular (LIU; WU, 2010). Por outro lado, pesquisas epidemiológicas também demonstram que populações da China, Gâmbia, África Ocidental apresentam alta incidência de câncer hepatocelular, uma vez que, a avaliação do biomarcador de exposição, AFB₁-N7-gua na urina, mostrou que o risco de desenvolver câncer hepatocelular era diretamente proporcional à ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas (WOGAN *et al.*, 2012).

Em crianças, a exposição às AFs vem sendo vinculada a hepatomegalia crônica (YUNGONG *et al.*, 2012). Estudo desenvolvido em Nairobi (África Oriental), levantou a hipótese de que a exposição de aflatoxina M1 em crianças poderia estar associada a retardo de crescimento e alta prevalência de desnutrição pelos indivíduos (AMORAS; COSTA, 2021).

Outros estudos levantados associaram um tipo de desnutrição aguda classificada como Kwashiokor com a exposição crônica a AFB₁, onde se observou que crianças com Kwashiokor apresentavam níveis elevados de aflatoxina no sangue ou na urina, quando comparadas com crianças do grupo controle, que eram saudáveis ou com outras formas de desnutrição (INNOCENT-MUPUNGA; MNGQAWA; KETERERE, 2017).

A desnutrição e o déficit no crescimento em crianças pode ser consequência dos danos no intestino provocado por essas AFs, que podem resultar na má absorção de alguns nutrientes. Além disso, essa alteração deixa o organismo mais suscetível a patógenos intestinais e a

infecções (INNOCENT-MUPUNGA; MNGQAWA; KETERERE, 2017; MENEZES-FILHO *et al.*, 2020).

3.4 Ocorrência de Aflatoxinas em alimentos

Estima-se que, aproximadamente, 500 milhões de pessoas ao nível global estejam expostas às aflatoxinas através da alimentação (SMITH *et al.*, 2017). Alguns alimentos são mais suscetíveis a ocorrência das aflatoxinas, entre os quais se pode citar as leguminosas, nozes e oleaginosas, amêndoas, amendoins, semente de algodão, leite e fórmulas para lactentes, cacau, arroz e milho (EFSA, 2019).

A presença de AFs nos alimentos ocorre predominantemente em regiões com climas quentes e úmidos (DUARTE *et al.*, 2014). Existem duas formas de inserção das aflatoxinas nas cadeias alimentares: uma por contaminação direta, quando o fungo toxicógeno contamina o produto e, em sequência sintetiza a micotoxina e ambos permanecem no produto; e por contaminação indireta, em que a micotoxina estará presente no produto final resultante de contaminação fúngica prévia, porém o fungo foi eliminado no processamento (XIULAN, 2005).

A contaminação pode decorrer antes ou depois da colheita e pode variar de acordo com as condições ambientais (nutrientes, luz, oxigênio, temperatura, pH, umidade relativa do ar e do substrato), condições de transporte (terrestre e marítimo), métodos de processamento, produção e armazenamentos dos produtos. A umidade é um dos fatores que mais tem influência na produção de AFs, (SANTIN, 2005; MOUSAVIZADEH *et al.*, 2017). Existem outros fatores demonstrados na literatura que também podem contribuir para a contaminação do milho e, consequente produção das micotoxinas dos quais podem ser, o genótipo, momento de colheita, danos mecânicos, tempo entre colheita, secagem, resultando na redução da qualidade sanitária, física e nutricional dos grãos e seus derivados (PATERSON; LIMA, 2010; BENTO *et al.*, 2012).

O milho é um dos cereais mais vulneráveis ao desenvolvimento de fungos toxicógenos (ZUMMO; SCOTT, 1992). As micotoxinas possíveis de serem encontradas no milho são produzidas principalmente por espécies dos géneros *Fusarium* (fumonisinas e zearalenona), *Aspergillus* (aflatoxinas e ocratoxinas) e *Penicillium* (ocratoxinas) (ALMEIDA *et al.*, 2000; SCUDAMORE; PATEL, 2000).

Um teor elevado de umidade na farinha favorece o crescimento de fungos em específico do género *Aspergillus*, liberando assim micotoxinas que contaminam os grãos e seus derivados. Assim, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na sua Instrução Normativa Nº

263, de 23 de Setembro de 2005, nos seus requisitos específicos para farinhas, amido de cereais e farelos recomenda umidade máxima de 15,0% (g/100 g), (BRASIL, 2005).

O armazenamento é outro ponto crítico de controle para o combate ao risco de contaminação dos alimentos em geral e, em particular por aflatoxinas. Assim, várias técnicas comprovadas reduzem o aumento da contaminação por aflatoxinas no armazenamento. O projeto AflaStop da *United States Agency for International Development* (USAID) no Quênia tem produzido resultados que mostram os benefícios do armazenamento hermética (PICS, sacos do tipo Grain Pro Grain Safe, Grain Pro Super, silos do tipo Metal Silo e Plastic Silo). Estes métodos podem produzir potencialmente uma diminuição de 95% no aumento dos níveis de aflatoxinas em comparação com os métodos normais de armazenamento (USAID, 2023).

O Instituto de Pesquisa Agrícola da Zâmbia (ZARI) promove a adoção de unidades de armazenamento de alumínio como um método de armazenamento seguro e livre de inseticidas. Quando completamente cheias, os fungos causadores de aflatoxinas não podem crescer devido aos níveis bastante reduzidos de oxigênio (USAID, 2023).

A maioria dos países desenvolvidos não autorizam importações de produtos alimentares com quantidades de AFs acima dos limites especificados. Por isso, os níveis de contaminação dos alimentos com as aflatoxinas têm também implicações para o comércio internacional. A Tabela 3 apresenta um resumo dos principais estudos desenvolvidos em Moçambique que quantificaram aflatoxinas em amostras de milho e produtos a base de milho.

Tabela 3 – Principais estudos sobre aflatoxinas no milho e seus derivados em Moçambique

Região de Moçambique	Tipo de amostra	Número de amostras (ocorrência %)	Média $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Mediana $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Referência
Inhambane	Derivados de Milho	32 (87,0%)	22,6 ^a	22,6	Casadei, (1980)
	Farinha de Milho	31 (52,0)	18,3 ^a	10,0	
	Milho	18 (67,0)	22,0 ^a	21,0	
Inhambane	Milho e				Van Rensburg <i>et al.</i> (1985)
Manhiça (Maputo)	Refeições diversas	168 (-)	2,4 ^a	N/D	
Nampula	Milho	13 (-)	N/D	69,9	Warth <i>et al.</i> (2012)
Províncias do norte e centro de Moçambique	Milho	307 (5,1%)	9,3 ^a	N/D	Augusto <i>et al.</i> (2014)

Em Moçambique, em especial na cidade de Nampula, poucas foram pesquisas feitas referentes à ocorrência de micotoxinas em produtos derivados do milho que se destinam ao consumo humano conforme ilustrado na Tabela 3. Sendo, o milho e seus derivados produtos alimentares bastante consumido em suas diferentes formas pela população moçambicana, torna-se imperioso a realização de estudo para identificação e quantificação dos quatro principais tipos de aflatoxinas e posterior avaliação do risco carcinogénico decorrente do consumo dos seus derivados uma vez que este alimento fornece 80% da necessidades energéticas para população rural de Moçambique uma vez que depende deste alimento como base da sua dieta.

3.5 Descrição das regiões de estudos e da produção de milho em Moçambique e na África

3.5.1 Breve caracterização da região de estudo

Moçambique é um país da costa oriental da África Austral que tem como limites: a norte, a Tanzânia; a noroeste, o Malawi e a Zâmbia; a oeste, o Zimbabwe, a África do Sul e a Essuatíni; a sul, a África do Sul; a leste, a secção do Oceano Índico designada por Canal de Moçambique (Figura 4). O Canal de Moçambique é vizinho de Madagáscar, da possessão francesa de Mayotte e do departamento ultramarino francês das Ilhas Reunião. O país possui uma superfície de 799,380 km², que tem uma fronteira terrestre de 4,330 km e uma costa de 2,470 km. É dividido administrativamente em 11 províncias (Niassa, Cabo Delgado e Nampula – norte; Zambézia, Tete, Manica e Sofala – centro; Gaza, Inhambane, Maputo província e Maputo cidade - sul) e a capital (Maputo cidade). É abundante em recursos naturais, entre os quais vale salientar energia hidroelétrica, gás, carvão, minerais, madeiras e terras agricultáveis (INE, 2005, 2011).

De acordo com o último censo populacional realizado pelo INE (Instituto Nacional de Estatística) em 2017, Moçambique apresenta uma população de 27 909 798 habitantes, dos quais 14 561 352 são mulheres, o que corresponde a 52 % e 13 348 446 são homens correspondentes, a 48% da população. O número médio de filhos por mulher nas famílias moçambicanas é de 5.2 filhos, a distribuição das idades está da seguinte maneira: dos 0 aos 14 anos, 46,6%, dos 15 aos 64 anos, 50,1% e acima dos 65 anos, 3,3 %. Deste número, 33,4% vive na zona urbana e 66,6% na zona rural, sendo que 39% da população com a idade a partir de 15 anos e mais não sabem ler nem escrever, 38,6% das crianças de zero aos 17 anos estão fora do sistema escolar; em cada 100 pessoas 99 dependem de outras para suportá-las em todas as suas despesas (INE, 2017).

Figura 4 – Localização geográfica de Moçambique e sua divisão administrativa/províncias



Fonte: Desenho adaptado do estudo mediante o Google Maps.

A taxa de analfabetismo corresponde a 39%, a taxa de mortalidade 11,8% e a expectativa de vida 53,7 anos. As principais religiões ou crenças que predominam são a Católica seguida da Islâmica. Moçambique é um país de clima quente e úmido. Sua língua oficial é o Português, mas com predominância de várias outras línguas nacionais de origem Bantu entre as quais: Maconde ou Shimakonde, Macua ou Emakhuwa, Xisena, Xitsonga, Xironga, entre outras (INE, 2017). Em 2017, a taxa do produto interno bruto (PIB) diminuiu para 3,1%, abaixo do valor de 3,8% registado em 2016 (BANCO MUNDIAL, 2017).

Apesar de a agricultura ser um dos setores chave para o desenvolvimento econômico do país, esta não consegue suprir as necessidades alimentares da população, pois as variações climáticas, em particular, as de pluviosidade, fazem com que 98% das explorações agrícolas desenvolvam a agricultura de sequeiro, contribuindo assim com a variação da taxa de crescimento do setor agrário (MINAG, 2014).

3.6 Aflatoxinas no Milho

3.6.1 Milho

O milho ou *Zea mays* L. (o nome botânico) é uma cultura anual que pertence a família botânica Gramineae, que inclui capins, gramas, bambús e, outras culturas como a mapira e a mexoeira. É originário de um capim chamado teosinte do sul do México. Depois de mais de 9.000 anos de domesticação nas civilizações indígenas – as Mayas e as Aztecas e outras – e séculos de viagens de exploração dos espanhóis primeiro, e depois dos portugueses, que levaram o milho no início até a Nigéria e o Congo, finalmente esta cultura chegou ao território moçambicano (SÁNCHEZ *et al.*, 2011)

O milho é o segundo cereal mais importante em termos de produção no mundo, após o trigo, seguido do arroz e o primeiro quanto ao rendimento por hectare. Na África subsaariana, o milho é a segunda cultura mais importante depois da mandioca. Em Moçambique, é a principal cultura de subsistência alimentar para a maior parte da população que vive nas zonas rurais, e representa (80%) fonte de calorias. Dentre outras formas é também consumido como farinha, e é considerado alimento de primeira necessidade pelo Ministério de Saúde de Moçambique (SÁNCHEZ *et al.*, 2011; ABBAS, 2017).

De acordo com ANVISA, farinhas são os produtos obtidos de partes comestíveis de um ou mais cereais, leguminosas, frutos, sementes, tubérculos e rizomas por moagem e ou outros processos tecnológicos considerados seguros para a produção de alimentos (Instrução Normativa N° 263, de 23 de Setembro de 2005. BRASIL, 2005). O milho é um dos cereais mais vulneráveis ao desenvolvimento de fungos toxicógenos (ZUMMO; SCOTT, 1992). As micotoxinas possíveis de serem encontradas no milho são produzidas principalmente por espécies dos gêneros *Fusarium* (fumonisinas e zearalenona), *Aspergillus* (aflatoxinas e ocratoxinas) e *Penicillium* (ocratoxinas) (ALMEIDA *et al.*, 2000; SCUDAMORE; PATEL, 2000; MACHINSKI *et al.* 2001).

A produção total de milho tem aumentado ao longo dos últimos anos, a Tabela 4 demonstra os valores de produção média de milho durante o período de 2015-2020 de alimentos considerados de necessidade básica em alguns países da África austral e vizinhos de Moçambique.

Tabela 4 – Produção de Alimentos básicos de alguns países da África austral que fazem fronteira com Moçambique, período de 2015-2020

País	MP de 2015-2020	Produção	Área (ha)	Produtividade	Exportação (t)	Perda (%)
África do Sul	Milho	12273166,7	2409680	5,05	1560493,7	3,43
	Arroz	3075,17	1111,67	2,77	5116,83	3,26
	Milho	3065275,8	1709226	1,79	2127,5	17,13
	Arroz	117793,3	65270,83	1,79	5,17	3,43
Malawi	Mandioca	5324574,18	234170,7	22,72	15542,7	3,77
	Milho	993158,3	998585,8	1,01	1644,83	10,11
	Arroz	1343	4112,8	0,33	0,17	2,02
Zimbabwe	Mandioca	249921,3	52574	4,75	28,26	5,16
	Milho	6228115	3780076	1,65	94917	9,98
	Arroz	3005881,3	1162943	2,58	2121,3	1,1
Tanzânia	Mandioca	6557162,2	1054203	6,33	15702,3	5,79
	Milho	1365640	1738375	0,79	1784	5,16
	Arroz	147734	303467	0,49	10	4,49
Moçambique	Mandioca	4802276	776697	6,19	0	16,01

MP = Média do período

Fonte: FAOSTAT, 2020

MP – Média de produção

ha- Hectares

t - Toneladas

De acordo com o Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), existem dezasseis variedades de milho das quais seis são híbridos e quase todas as sementes estão sendo produzidas e comercializadas em Moçambique (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DESENVOLVIMENTO RURAL, 2023).

3.6.2 Consumo e Processo de produção da Farinha

A principal forma de utilização do milho em Moçambique em forma de farinha serve para fazer *xima*, *uthua*, *ugali*, *sadza* “[...] são designações de diferentes regiões do país da massa de farinha de milho cozida e pronto para o consumo[...]”. O milho é ainda consumido em forma de maçaroca (cozida ou assada) e quando seco pode ser consumido torrado. A parte do farelo do grão é também usada para preparação de bebidas alcoólicas fermentadas (*bwadua*, *moa*, *doro*, *cabanga*, *Maheu* e mais) (SÁNCHEZ *et al.*, 2011). Tschirley e Abdula (2007) relatam que, em Moçambique existem três principais tipos de moinhos¹ de milho. O primeiro é o considerado por moagem caseira, o segundo, são por meio de moageiros de pequena a média e por último, existem os moageiros industriais que processam várias qualidades de farinha de milho, que, posteriormente, irão abastecer a rede de vendedores de atacado e varejo. Diferentes qualidades de farinha de milho podem ser produzidas a partir dessas opções de moagem diferentes. As taxas de extração podem ir de 100%, em que todo o grão de milho é utilizado na criação da farinha (pequena escala, típica de moinhos de martelos), a 65% de taxa de extração, em que o embrião do milho e outros componentes são removidos. Na Tabela 5 estão demonstrados estudos feitos em diferentes regiões do mundo relatando a ocorrência de micotoxinas em diferentes matrizes incluindo o grão de milho e seus derivados, assim como os métodos analíticos utilizados para a sua identificação. Vale ressaltar que, a correlação entre as concentrações de micotoxinas encontradas no grão de milho não processado e nos seus derivados não é muito clara, porém há evidências que os derivados de milho processados apresentam concentrações mais baixas relativamente aos grãos não processados. Nesta esfera, outros estudos desenvolvidos tem demonstrado que, limpeza inicial do grão de milho em moinhos mostrou uma redução relativamente maior em teores de aflatoxinas em comparação com as fumonosinas (SCUDAMORE; PATEL, 2000).

¹ Máquinas para transformarem o grão de milho em farinhas de diversos tipos e qualidades

Tabela 5 – Ocorrência de aflatoxinas no Mundo em diferentes matrizes e os métodos analíticos usados.

Região de Origem	N	Tipo de amostra	Método analítico	Aflatoxinas	Solvente de extração	REC (%)	LOD	LOQ	Incidência (%)	Concentração média (ug.kg ⁻¹)	Autoria
Maringá, Paraná (Brasil)	121	Alimentos a base de Milho	CCD	AFB1, AFB2, AfG1 e AFG2	ACN: Água (84:16)				3 AFB1; 1,7 AFB2	33,5 AFB1; 2,4 AFB2	Machinski Júnior <i>et al.</i> (2005)
Rio de Janeiro	N/D	Castanha, Milho e amendoim	CLAE/Kroba /DFL	AFB1, AFB2, AfG1 e AFG2	ACN: Água (84:16)	89 - 101	0,02 - 0,04 ug.kg ⁻¹	0,08 - 0,13 ug.kg ⁻¹	100	N/D	Castro <i>et al.</i> (2013)
Peraná, MT e MS	123 72	Grãos de milho	ELISA	AFT, FUM e ZEA	Metanol: Água (70:30)	N/D	1,5 ug.kg ⁻¹	5,0 ug.kg ⁻¹	N/D	20,5; 16,7 e 9,1 AFT	Mistura e Lindino (2020)
Moçambique e Mato Grosso, Brasil	44 84	Amendoim Grãos de milho	Fluorimetro CLAE/DFL	AFT AFB1, AFB2,	Metanol: Água (70:30) ACN: Água (84:16)	N/D 58,9 - 101,2	N/D	N/D 0,4 - 1,3 ug.kg ⁻¹	100 21,4	17,05 -150 AFT N/D	Gabriel (2014) Bento (2012)

AFG1 e AFG2											
Aflatoxinas											
Argentina	270	Gãos de milho	HPLC/DFL	, ZEA e DON	N/D	N/D	N/D	N/D	40 AFB1	N/D	Castellari <i>et al.</i> (2015)
		Várias amostras		AFB1, DON e	Metanol: Água				81,9 - 100		
China	350	incluindo milho	HPLC/DFL	ZEA	(80:20)	N/D	0,5 ug.kg ⁻¹	1,5 ug.kg ⁻¹	AFB1	1,2–27,4 AFB1	Zhao <i>et al.</i> (2021)
Bangkok- Thailandia	100	Alimentos a base de trigo (macarrão e pão)	LC-MS/MS	DON e AFB1	ACN: Água: Ác. acético (79:20:1)	N/D	0,4 ng/g	N/D	0,0	N/D	Pralatnet (2016)
Zimbabwe	29	Amendoim e manteteiga de amendoim	HPLC/DFL	AFT	Metanol: Água (80:20)	75 - 85	N/D	N/D	91 AFT	75,66 ng/g	Mupunga <i>et al.</i> (2014)

Namíbia	105	Milheto, sorgo e bebida tradicional	LC-MS/MS	AFB1 e várias micotoxinas	ACN: Água: Ác. Acético (79:20:1)	N/D	N/D	N/D	13-50 AFB1	0,1-2,0 AFB1; 0,2-25 AFB1	Misihairabgwi <i>et al.</i> (2018)
Botswana	120	Amendoim fresco	HPLC/DFL	AFB1, AFB2, AfG1 e AFG2	Metanol: Água (85:15)	N/D	N/D	N/D	78 AFT	118 AFT	Fingani <i>et al.</i> (2004)
Burundi	50	Vários cereais	CCD/Fluorodensitometria	AFT e AFB e AFG	Clorofórmio: Acetona (90:10)	N/D	N/D	N/D	100 AFT	34 - 7,929 ug.kg-1 AFT	Munimbazi; Bullerman (1996)
Quênia	338	Farinha de milho e grãos de milho	UHPLC/DFL	AFT e AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2	Metanol: Água (70:30)	89,4 - 92,3	0,001- 0,036 ug.kg ⁻¹	0,01- 0,12 ug.kg ⁻¹	100 AFT e 97,1 AFB1	57,9 AFB1	Nabwire <i>et al.</i> (2019)
São Paulo	110	Grãos de milho	TLC	AFB1, OTA e ZEA	N/D	N/D	N/D	N/D	54,5	168 AFB1, 17 AFB2	Machinski <i>et al.</i> (2001)

Várias regiões do Brasil	214	Grãos de milho	TLC	AFT, FUM e ZEA	Acetona: Água (97:3)	85 - 97	0,10 - 0,02 ug.kg ⁻¹	N/D	38,0 AFT; 38,3 AFB1	11,0 AFT, 9,4 AFB1	Vargas <i>et al.</i> (2001)
Distrito Federal	366	Vários alimentos e pipoca de Milho	CCD/Fluoroscência	AFT e OTA	Metanol (100)	N/D	N/D	2,0 ug.kg ⁻¹	6,3	111-404 AFT	Caldas <i>et al.</i> (2002)
Paraná	123	Alimentos a base de Milho	CCD e ELISA/espectrofotometria UV	AFT	Metanol: Cloreto de potássio (90:10) CCD; Metanol (70) ELISA	109,9 - 109,9	0,5 - 3,2 ug.kg ⁻¹	N/D	7 CCD, 16 ELISA	0,62 CCD e 0,78 ELISA	Amaral <i>et al.</i> (2006)
Quênia	40	Milho, farinha de milho e	HPLC/DFL	AFT	Água: Acetona (90:10)	N/D	N/D	N/D	45, 35 e 20	53, 6 e 10	Kilonzo <i>et al.</i> (2015)

		outro alimento										
Benin, Mali e Togo	180	Vários produtos alimentares secos	HPLC/DFL	AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2	Metanol: Água (85:15)	N/D	N/D	N/D	N/D	5,4 AFB1 0,6 AFB2	Hell <i>et al.</i> (2009)	
Benin e Togo - África	505 e 175	Amendoim e milho	Densitometri a de Flouresncenc ia	AFB1	N/D	N/D	N/D	N/D	90,8	7,6 e 27,6	Egal <i>et al.</i> (2005)	
Goiás	N/D	Grãos de milho	HPLC/DFL	AFT	Metanol: Água (70:30)		1,5 - 2,0 ng	N/D	100	N/D	Ramos <i>et al.</i> (2008)	

ELISA - Ensaio Imunoenzimático; HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; HPLC-MS - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas; HPLC-DFL - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detetor de Fluorescência; N - amostras; N/D - valor não disponível; TLC - Cromatografia de Camada Fina; CCD/Fluorodensitometria – Cromatografia em Camada Delgada acoplada à Fluorodensitometria; ELISA/Espectofotometria UV - Ensaio Imunoenzimático acoplada à Espectofotometria Ultra Violeta; REC – Recuperação; AFT – Aflatoxinas (B1+B2+G1+G2); FUM – Fumonisinias; ZEA – Zearalenona; DON – Deoxinivalenol; OTA –Ocratoxina A.

3.6.3 Métodos analíticos para detecção e quantificação de Aflatoxinas

Atualmente os métodos analíticos comumente utilizados na determinação de AFs encontram-se disponíveis em vários laboratórios de alimentos e rações de diferentes instituições ou entidades, entre as quais pode-se citar a Cromatografia em Camada Fina (TLC), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Cromatografia Gasosa (GC), Eletroforese Capilar (CE) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Consistem em métodos reconhecidos pelos laboratórios a nível internacional e pelas entidades oficiais como a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e o Comité Europeu de Normalização (CEN) (JAIMEZ *et al.*, 2000; RAHMANI *et al.*, 2010; TADEO *et al.*, 2010; WACOO *et al.*, 2014; TAO *et al.*, 2018;).

A implementação dos métodos analíticos para análise de aflatoxinas são precedidos de algumas etapas, entre as quais a extração, limpeza/purificação, detecção e quantificação. O preparo da amostra é uma etapa que consome bastante tempo e se não for feita de maneira adequada pode contribuir com o erro dos resultados (JAIMEZ *et al.*, 2000). O método analítico escolhido neste trabalho corresponde a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplado a um detetor de fluorescência, que posteriormente será abordado com mais detalhes.

3.6.4 Amostragem

A quantidade de grãos a ser analisada é, em geral, muito pequena em relação ao tamanho do lote, assim a amostra deverá possuir características similares em todos os aspectos, correspondentes às médias do lote do qual foi retirada. A amostragem para análise de micotoxinas em alimentos deve seguir as especificações previstas nos regulamentos normativos. De acordo com Jamez *et al.* (2000), amostragem consiste na seleção de uma amostra representativa da população para o estudo. Uma amostra não representativa poderá invalidar a análise das micotoxinas.

Por outro lado, uma retirada representativa do alimento e sua correta homogeneização são imprescindíveis para que a análise da amostra seja bem-sucedida, uma vez que as micotoxinas não se distribuem uniformemente pelo alimento. Resolução -RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002 – ANVISA, estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de micotoxinas nos grãos e seus derivados. Segundo o regulamento, a amostragem desempenha um papel imprescindível na determinação exata do teor de micotoxinas. A amostragem de milho deverá ser executada tomando como base as recomendações dos Planos de Amostragem para análise de aflatoxinas em Milho e Amendoim – *FAO Food and Nutrition Paper* 55, 1993, devendo ser utilizada a Norma de Amostragem ISO 950, 1979 - Amostragem de Cereais em Grãos.

O regulamento prevê que a amostragem também pode ser feita nas extremidades de um transportador ou na saída dos grãos. Num elevador de caneca, as amostras são coletadas na saída da moega alimentadora dos canecos, ou na saída superior do elevador. Neste caso, em períodos determinados, retirando-se uma amostra com a caneca. Para a correta análise de AFs deve-se evitar a exposição à luz solar, visto que se decompõem progressivamente sob influência da luz UV (EC, 2006).

3.6.5 Extração com solventes

Este passo consiste em extrair a micotoxina de uma matriz sólida por intermédio de um solvente de forma a remover possíveis interferências. É, portanto, um passo vital para o sucesso do ensaio (TURNER *et al.*, 2015). Normalmente é utilizada um solvente extrator para extração de micotoxinas em grãos, cereais e outras matrizes sólidas. O solvente a ser utilizado depende das características físico-químicas do analito a ser extraído. A maioria das micotoxinas é solúvel em solventes polares e ligeiramente polares e insolúveis em solventes apolares. Assim sendo, a extração tem sido realizada com misturas de solventes orgânicos como: acetona, acetonitrila, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila ou metanol (JAIMEZ *et al.*, 2000; TAO *et al.*, 2018). É extremamente importante que sejam devidamente controlados a relação entre a amostra e o solvente, o tempo de extração e a temperatura para que ocorra uma correta quantificação da toxina (PEREIRA *et al.*, 2014; FERNANDES, 2016)

De acordo com Pereira *et al.* (2014), os estudos realizados com mistura de solventes mostram que a mistura de metanol com acetonitrila permite uma co-extração de componentes indesejados da matriz sólida. E, quando preparado na proporção acetonitrila: água (84:16 v,v) produziu menos compostos interferentes do que em outras misturas.

De modo a melhorar a eficiência da extração, pode-se fazer utilização de água ou sua acidificação, uma vez que a água aumenta a penetração do solvente dentro da matriz. Por outro lado, a acidificação auxilia na quebra de interações moleculares entre a toxina e outros constituintes como proteínas e açúcares (JAIMEZ *et al.*, 2000; TAO *et al.*, 2018). Muitas vezes solventes apolares são utilizados antes de realizar a extração em fase sólida de modo a remover componentes lipofílicos.

Após o processo de extração, segue-se a filtração ou centrifugação do extrato, e por fim a purificação antes da determinação do teor de AFs. No entanto, os métodos imunológicos, como o ensaio ELISA, não necessitam desta etapa, tal como, o método LC-MS/MS baseado no procedimento “diluir e disparar” (TAO *et al.*, 2018).

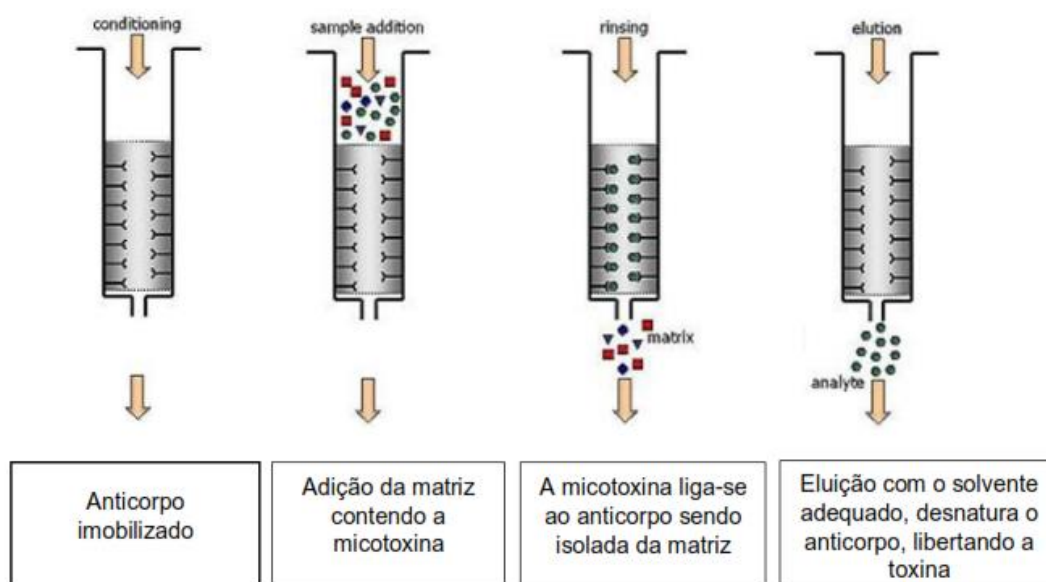
Os procedimentos de *clean-up* mais usados consistem na extração em fase sólida (SPE – sigla para Solid Phase Extraction), extração líquido-líquido, extração de fluido supercrítico

(SFE), e colunas de imunoafinidade (CIA). O último método referido apresenta maior seletividade (JAIMEZ *et al.*, 2000; TURNER *et al.*, 2015; 2010; TAO *et al.*, 2015).

As CIAs são consideradas um método imunoquímico utilizado para *Clean up*, purificação e pode ser aplicado em vários tipos de matrizes (PEREIRA *et al.*, 2014; FERNANDES, 2016). As colunas são compostas por uma fase sólida constituída por anticorpos específicos para cada tipo de micotoxina. Quando a coluna é carregada com o extrato, o analito de interesse liga-se seletivamente ao anticorpo, enquanto as impurezas são lixiviadas (VICAM, USA).

As condições de carregamento, lavagem e eluição das CIAs devem ser bem estabelecidas (MACKAY *et al.*, 2022). Na sequência, o analito é eluído por intermédio de um solvente ou uma mistura de solventes, de acordo com a micotoxina a ser estudada, conforme pode-se ver demonstrado na Figura 5. Para as aflatoxinas o eluente mais indicado é o metanol, pois apresenta menor agressividade aos anticorpos da CIA quando comparado com a acetonitrila e a acetona (VICAM, USA; BERTUZZI *et al.*, 2011, PEREIRA *et al.*, 2014; FERNANDES, 2016).

Figura 5 – Princípio de funcionamento de uma coluna de imunoafinidade e o processo de eluição



Fonte: Adaptado de Kos (2015)

3.6.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O HPLC (do Inglês – *high-performance liquid chromatography*), é o método de eleição na determinação de AFs, devido às suas vantagens comparativamente com outros métodos analíticos (JAIMEZ *et al.*, 2000; WACOO *et al.*, 2014). Este método emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel eluída sob altas pressões e tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de matrizes (COLLINS *et al.*, 2017)

Sendo um método cromatográfico, usa uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase estacionária pode estar contida em um tubo de vidro ou metálico inoxidável. Por outro lado, a fase móvel, pode ser constituída por uma solução aquosa acídica ou em gradiente com metanol e acetonitrila (WACOO *et al.*, 2014). Em cromatografia líquida, a depender das características da fase estacionária, ela pode ser cromatografia líquida em fase normal ou fase reversa, porém, a fase reversa é mais utilizada, pois oferece maior versatilidade de aplicação.

3.7 Avaliação de risco

Nos alimentos que consumimos está presente uma grande variedade de substâncias químicas tóxicas entre as quais as micotoxinas, e a presença excessiva no alimento dessas substâncias consideradas tóxicas pode significar um risco à saúde humana (JARDIM; CALDAS, 2009). De forma a avaliar a exposição das populações a aflatoxinas, procede-se a avaliação de risco por meio de várias técnicas já comprovadas pela comunidade científica.

A avaliação de risco tem o objetivo de estimar o risco de ocorrência de efeito adverso após a exposição humana a substâncias tóxicas, considerando as características intrínsecas das substâncias e do sistema alvo (IPCS, 2009). Este procedimento pode ser utilizado para avaliação da exposição humana às aflatoxinas, uma vez que estas são consideradas substâncias potencialmente tóxicas à saúde humana (IPCS, 2009; IARC, 2012).

O método para a determinação da avaliação de risco pode ser dividido em quatro etapas, entre as quais a primeira consiste na identificação do dano (ou perigo), a segunda na caracterização da relação dose resposta, seguida por avaliação da exposição e por último a caracterização do risco (JARDIM; CALDAS, 2009).

Na identificação do dano, sendo esta a primeira etapa neste processo, tem como finalidade identificar os efeitos adversos relacionados a exposição à determinada substância química. Na sequência, é realizada a caracterização da relação dose-resposta através da avaliação da relação quantitativa da exposição e a incidência da resposta de um efeito adverso. Entretanto, a avaliação da exposição consiste na estimativa da ingestão provável de substâncias

tóxicas. Assim, a avaliação é feita mediante os dados de consumo do alimento em estudo, concentração da substância no alimento e peso corpóreo médio da população em estudo (JARDIM; CALDAS, 2009). Na fase final do processo avaliativo, é feita a caracterização do risco, na qual se estima a probabilidade da ocorrência do efeito adverso na população exposta.

A escolha da metodologia para caracterização do risco depende da toxicidade da substância a ser estudada. De acordo com a IARC (2012), as aflatoxinas são classificadas como substâncias carcinogênicas para seres humanos. A caracterização do risco para substâncias carcinogênicas e genotóxicas pode ser feita de acordo com quatro metodologias: (i) o princípio ALARA (As Low As Reasonably Achievable), refere-se à possibilidade de reduzir a exposição ao nível mais baixo que seja possível; ii) a extrapolação para doses de exposição aceitável/conhecida a partir de estudos de carcinogenicidade com roedores (estratégia utilizada pelo JECFA para aflatoxinas, como descrito anteriormente); iii) a aplicação do TTC (*threshold of toxicological concern*), que indica um valor único de exposição segura para todas as substâncias e (iv) o cálculo da Margem de Exposição (MOE sigla do termo em inglês: *Margin of Exposure*). A MOE é calculada através da razão entre a referência toxicológica e a exposição, o valor obtido dessa razão é utilizado para caracterizar o risco (JARDIM; CALDAS, 2009).

A MOE igual ou superior a 10.000 tem sido caracterizada como de risco negligível sob ponto de vista da saúde pública e valores inferiores a 10.000 indicam que há um risco de exposição carcinogênico do contaminante analisado. Valores da MOE inferiores a 125 indicam que além dos efeitos carcinogênicos, deve-se ter a preocupação com relação aos efeitos nefrotóxicos (JARDIM; CALDAS, 2009; ESPOSITO *et al.*, 2017).

Um estudo desenvolvido por Amaral *et al.* (2006), onde avaliou a ocorrência de aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana com base na comparação da Ingestão diária provável média (IDP_M) e Ingestão diária tolerável (IDT). Neste estudo constatou-se um risco significativo à saúde pública brasileira decorrente da exposição crônica à AFB₁ pela dieta com alimentos derivados do milho, em especial o fubá.

Não é de nosso conhecimento a existência de dados sobre a caracterização do risco de exposição via oral às aflatoxinas devido ao consumo de milho e seus derivados em Moçambique. A realização da avaliação de risco é extremamente importante, pois a avaliação considera os dados de consumo específicos da população em estudo. Essas informações podem contribuir na tomada de decisões preventivas por parte das autoridades moçambicanas competentes para que em sinergias, possam produzir legislações específicas que estabelecem limites máximos tolerados para os níveis de aflatoxinas no milho e seus derivados uma vez que este é um alimento de necessidade básica para a população de Moçambique.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. (In) segurança alimentar e território em Moçambique: discursos políticos e práticas. **Revista Nera**, v. 38, n. 1, p. 106-131, 2017.
- ALI, N. *et al.* Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 4, p. 377-384, 1998.
- ASAE, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal. 2009. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/noticias-/noticias-de-2012-e-anteriores/anteriores-a-2012/perfil-de-risco-dos-principais-alimentos-consumidos-em-portugal.aspx> Acesso em: 05 Out. de 2022.
- ALMEIDA SOUSA, T. M. Incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em diferentes genótipos de castanha do Brasil e avaliação dos óleos fixos no controle de *Aspergillus Flavus* produtores de aflatoxinas. Lavras, 2018.
- ALMEIDA, A. P. *et al.* Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 321-326, 2000.
- AMARAL, K. A. S. *et al.* Introdução Aflatoxinas em Produtos à Base de Milho Comercializados no Brasil e Riscos para a Saúde Humana. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.
- AMORAS, E. S.; COSTA, A. L. da. Aflatoxicoses: uma revisão das manifestações clínicas em seres humanos e animais. **Revista Arquivos Científicos**. v. 4, n. 1, p. 47-53, 2021.
- ANVISA. Instrução Normativa – IN Nº 263, de 23 de Setembro de 2005. Disponível em: <http://https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0263_22_09_2005.html> acesso em: 01 de Outubro de 2022.
- ANVISA. Instrução Normativa – IN Nº 160, DE 1º DE JULHO DE 2022. Disponível em: <http://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/instrucao-normativa-2021_88-anvisa.pdf> acesso em: 22 de agosto de 2022.

ARROYO-MANZANARES, N. *et al.* Aflatoxins in animal feeds: A straightforward and cost-effective analytical method. **Food Control**, v. 54, n. 1, p. 74-78, 2015.

ASAE, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Perfil de risco dos principais

ASAI, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Riscos e Alimentos: Alimentação e gravidez. n.º 10. 2015

AUGUSTO, J. *et al.* Prevalence and distribution of *Aspergillus section flavi* in maize and groundnut fields and aflatoxin contamination in Mozambique. In Proceedings of the 2014 APS-CPS Joint Meeting, Minneapolis, MN, USA, 9–13 August 2014; The American Phytopathological Society: Minneapolis, MN, USA, 2014.

BANCO MUNDIAL. Atualidade econômica de Moçambique: tirando proveito de transformação demográfica. Banco Mundial: Washington DC, (2017).

BANCO MUNDIAL. Mozambique: Analysis of Public Expenditure in Agriculture. Report N°

BENTO, L. F. *et al.* Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 44–9, 2012.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-23, 2002.

CAMBAZA, E.; KOSEKI, S.; KAWAMURA, S. Aflatoxins in Mozambique: Etiology, epidemiology and control. **Agriculture**, v. 8, n. 7, p. 87 – 90, 2018.

CASADEI, E. Os contaminantes nos alimentos. In Moçambique: Águas, Alimentos e Ambiente; Molisv: Rome, Italy, 1980.

CASTELLARI, C. C. *et al.* Factores extrínsecos e intrínsecos asociados a poblaciones fúngicas micotoxigénicas de granos de maíz (*Zea mays* L.) almacenados en silos bolsa en Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 4, p. 350–359, 2015.

CASTRO, I. M. de; DOS ANJOS, M. R.; TEIXEIRA, A. da S. Análise de Aflatoxinas B1, G1, B2 e G2 em Castanha-do-Brasil, Milho e Amendoim Utilizando Derivatização Pós-Coluna no Sistema Cromatográfico CLAE/ Kobra Cell®/DFL. Comunicado Técnico, 2013.

CESAR TONDO, E. Perigos nos alimentos. São Paulo, editor Senac. São Paulo, 2020.

CHEN, C. H. *et al.* Aflatoxin exposure and hepatitis C virus in advanced liver disease in a hepatitis C virus endemic area in Taiwan. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 747-52, 2007.

COLL, H. A. S.; CASTRO, N. C. Micotoxycosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. **Revista CES Medicina**, v. 29, n. 1, p. 143-152, 2015.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografía**. 7^a ed, Campinas: Unicamp, 2017.

DUARTE, S. C.; PENA, A. L. S.; DE MATOS LINO, C. Mycotoxins and their Implications in food safety. **Future Science Ltd**, v. 71, n. 1, p. 158-165, 2014.

EC, European Commission. Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão, de 23 de fevereiro de 2006, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. OJ L. 70.12–34, 2006.

EFSA, European Food Safety Authority - Scientific Opinion. Risk assessment of aflatoxins in food. **EFSA Journal**, v. 18, n. 3, p. 6040, 2020.

EFSA, European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of aflatoxins in food. **The EFSA Journal**, v. 1, n. 1, 2019.

EGAL, S. *et al.* Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 215 – 224, 2005.

EL-KASSAS, M.; ELBADRY, M. Hepatocellular Carcinoma in Africa: Challenges and Opportunities. **Frontiers in Medicine**, v. 9, n. 899420, p. 1-4, 2022.

ESPOSITO, F. *et al.* Determination of acrylamide levels in potato crisps and other snacks and exposure risk assessment through a Margin of Exposure approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, n. 249256, 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pis. **EFSA J.**, v. 446, p. 1–127, 2007.

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. **FAO Food and**
FERNANDES, M.S. Validação do método de quantificação de ocratoxina A por HPLC em
cereais e café no laboratório da SGS Portugal. 2016. Dissertação de mestrado. Faculdade de
Ciências e Tecnologia Universidade de Lisboa – Lisboa, 67p.

FINGANI, A. M.; SIAME, B. A.; TAYLOR, J. E. Fungi, Aflatoxins and Cyclopiazonic Acid
Associated with Peanut Retailing in Botswana. **In Journal of Food Protection**, v. 67, n. 1, p.
96-102, 2004.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. As micotoxinas. **Revista FI** 7, v.1, n., p. 32-40, 2009.

GABRIEL, M. Avaliação da micoflora e níveis de aflatoxinas totais em grãos de amendoim
comercializados no Distrito de Mocuba. 2014. Dissertação de mestrado. Faculdade de
Engenharia Agronômica e Florestal - Universidade Zambeze – Zambézia, p.49

GODOY, H. Ocorrência de aflatoxinas em rações e tilápias. Dissertação de mestrado, USP, SP.
2018.

HABIBI, N. *et al.* Aflatoxin B1 exposure and the risk of hepatocellular carcinoma in Iranian
carriers of viral hepatitis B and C. **Toxin Reviews**, v. 38, n. 3, p. 234–239, 2019.

HELL, K. *et al.* Mycoflora and occurrence of aflatoxin in dried vegetables in Benin, Mali and
Togo, West Africa. **Int J Food Microbiol**, v. 135, n. 1, p.99–104, 2009.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of
carcinogenic risks to humans: chemical agents and related occupations. **A review of human
carcinogens**, v. 100, n. 1, p. 225–248, 2012.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Câncer de Fígado. Brasil. Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/figado>. 2012. Acesso em:
Julho/2023.

INE, Moçambique inquérito demográfico e de saúde. M. d. s. d. Moçambique. Maputo,
Moçambique, Instituto Nacional de Estatística, Moçambique: 7 e 8. (2005). Disponível em
<http://www.ine.gov.mz/pt/ResourceCenter>. Acesso em: 10 Nov. 2022.

INE. O IV Recenseamento Geral da População e Habitação de Moçambique. 2017.

International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental health criteria 240 – principles and methods for the risk assessment on chemicals in food. 2009. Disponível em: <http://tinyurl.com/pscgglx>. Acesso em: 06 Nov. 2022.

JAIMEZ, J. *et al.* Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, n. 12, p. 1-10, 2000.

JARDIM, A.N.O.; CALDAS, E.D. Exposição Humana a Substâncias Químicas Potencialmente Tóxicas na Dieta e os Riscos para Saúde. **Revista Quimica Nova**, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

JUBERT, C. *et al.* Effects of chlorophyll and chlorophyllin on low-dose aflatoxin B (1) pharmacokinetics in human volunteers. **Cancer Prevention Research** (Philadelphia, PA), v., n. 2, p. 1015-1022, 2009.

KEEHN, M.; FRANK-STROMBORG, A. worldwide perspective on the epidemiology and primary prevention of liver cancer. **Cancer Nurs**, v. 14, p. 163-74, 1991.

KILONZO, R.M. *et al.* Household dietary exposure to aflatoxins from maize and maize products in Kenya. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 12, p. 2055-2062, 2015.

KOK, W. T. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 659, n., p.127, 1994.

LIU, Y.; WU, F. Global Burden of Aflatoxin-Induced Hepatocellular Carcinoma: A Risk Assessment. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 6, p. 818–824, 2010.

MACHINSKI JUNIOR, M. *et al.* Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 289-294, 2005.

MACHINSKI, M. *et al.* Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food, J Sci Food Agri.**, v. 8, n. 1, p. 1001-1007, 2001.

MACIEL, L. F. *et al.* Aflatoxins and ochratoxin A in different cocoa clones (*Theobroma cacao* L.) developed in the southern region of Bahia, Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 1, p. 134-143, 2017.

MACKAY, N. *et al.* Analysis of Aflatoxins, Fumonisin, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Zearalenone, HT-2, and T-2 Toxins in Animal Feed by LC–MS/MS Using Cleanup with a Multi-Antibody Immunoaffinity Column. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 105, n. 5, p. 1330–1340, 2022.

MEDEIROS, F. H. V. *et al.* Biological Control of Mycotoxin-producing molds. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 5, p. 483-497, 2012.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Toxicologia de Alimentos. São Paulo: Varela, p. 295, 2000.

MINAG. Plano estratégico para o desenvolvimento do sector agrícola - PEDSA 2011-2020. Governo de Moçambique, Ministério da agricultura: 69. (2014). Disponível em http://www.minag.gov.mz/images/stories/pdf_files/pedsa/pedsafinal.pdf. Acesso em: 22 Mar. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MISAU); Instituto Nacional de Estatística (INE) e ICF International (ICFI). Moçambique Inquérito Demográfico e de Saúde 2011. Calverton, Maryland, USA: MISAU, INE e ICFI, Maputo, v.3, p.153-173, 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DESENVOLVIMENTO RURAL. Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM). Catálogo de Tecnologias Libertadas pelo IIAM / 2011-2022, Maputo, p. 18 – 22, 2023.

MISIHAIABGWI, J. M. *et al.* Diversity and fate of fungal metabolites during the preparation of oshikundu, a Namibian traditional fermented beverage. **World Mycotoxin Journal**, v. 11, n. 3, p. 471–481, 2018.

MISTURA, M., LINDINO, C. A. Incidence Of Mycotoxins in Maize in the States of Paraná, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul between 2015 and 2018. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 76671–76688, 2020.

MONTESANO R.; HAINAUT P.; WILD C.P. Hepatocellular carcinoma: from gene to public health. **J Natl Cancer Inst**, v. 89, n. 1, p. 1844–1851, 1997.

MOUSAVIZEDEH, A. *et al.* Determination of total aflatoxin in rice consumption in Yasuj, Iran. **An International Peer Reviewed Open Access Journal for Rapid Publication**, v. 1, n. 1, p. 195-198, 2017.

MUNIMBAZI, C.; e BULLERMAN, L. B. Molds and Mycotoxins in Foods from Burundi t. **In Journal of Food Protection**, v. 59, n. 8, p. 869-875, 1996.

MUPUNGA, I. *et al.* Natural occurrence of Aflatoxins in peanuts and peanut butter from Bulawayo, Zimbabwe. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 10, p. 1814–1818, 2014.

MUPUNGA, I.; MNGQAWA, P.; KATERERE, D.R. Peanuts, Aflatoxins and Undernutrition in Children in Sub-Saharan Africa. **Nutrients**, v. 9, n. 1287, p. 88-95, 2017.

NABWIRE, W. R. *et al.* Aflatoxin in household maize for human consumption in Kenya, East Africa. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, v. 13, n. 1, p. 45–51, 2020.

OGODO, A. C.; UGBOGU, O. C. Public health significance of aflatoxin in food Industry - A review. **European Journal of Clinical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 51–58, 2016.

OLIVEIRA, F.; GERMANO, L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 417-424, 1997.

ONCOGUIA, Portal da Oncoguia. Disponível em <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatisticas-para-cancer-de-figado/8289/207/>. Acesso em: Julho/2023.

PARKIN, M.; STJERNSWÄRD, J.; MUIR, S. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. **Bull. World Health Organ**, v. 62, n. 1, p. 163-82, 1984.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food?. **Food Research International**, v. 43, p. 1902-1914, 2010.

PEREIRA, V.L.; FERNANDES, J.O.; CUNHA, S.C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, n. 1, p. 96-136, 2014.

PRALATNET, S. *et al.* A. Survey of deoxynivalenol and aflatoxin B1 in instant noodles and bread consumed in Thailand by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 7, p. 1269–1272, 2016.

RAMOS, C. R. B. A.; BRASIL, E. M.; GERALDINE, R. M. Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho Cultivados em três regiões do estado de goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n. 2, p. 95-102, 2008.

RANEY, K. D. *et al.* The endo - 8, 9 - epoxide of aflatoxin B1: A new metabolite Chemical Research in Toxicology. **Food Control**, v. 5, n. 3, p. 333–335, 1992.

ROCHA, A. R. *et al.* Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in beers produced in Brazil and their carcinogenic risk evaluation. **Food Control**, v. 145, p. 1-7, 2023.

ROCHA, M. E. B. *et al.* Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 159-165, 2014.

RUSHING, B. R.; SELIM, M. I. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. **In Food and Chemical Toxicology**, v. 124, n., p. 81–100, 2019.

SALEH, I.; GOKTEPE, I. The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 82, n.2, 2019.

SÁNCHEZ, C. *et al.* MILHO: Uma cultura de boa Nutrição e de boa Energia. s/ed. Moçambique (Maputo), Atlas, 2011.

SANTIN, E. *et al.* Low level of aflatoxin in broiler at experimental conditions. Use of cell wall yeast as adsorbent of aflatoxin. **Archives of Veterinary Science**, 2005.

SANTOS, J. V. Validação e revalidação de métodos para a análise de micotoxinas: Aflatoxinas B1, B2, G1, G2, Desoxinivalenol, Zearalenona e Ocratoxina. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2018.

SASS, C. *et al.* Methods for chemical preparation of aflatoxin B1adducts, AFB1-N7guanine and AFB1-lysine. **Toxin Reviews**, v. 32, n. 4, p. 68–74, 2013.

SCUDAMORE, K. A.; PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 5, p. 407-416, 2000.

SMITH, L. E. *et al.* Aflatoxin exposure during pregnancy, maternal anemia, and adverse birth outcomes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 96, n. 4, p. 770-776, 2017.

SOARES C, A. L.; VENÂNCIO, A. Fungos produtores de micotoxinas. **Sociedade Portuguesa de Microbiologia**, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1822/27316>. Acesso em: 28 Julho 2022.

TADEO, J. L.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; MANSILLA, M. L. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. **In Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 2, p. 113–122, 2010.

TAO, F. *et al.* Recent development of optical methods in rapid and non-destructive detection of aflatoxin and fungal contamination in agricultural products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, n., p. 65-81, 2018.

TATTIBAYEVA, D. Presencia de elementos tóxicos y micotoxinas en cereales de Kazajistán. Facultad de Veterinaria da Universidade de Santiago de Compostela. Tese de Doutorado. 2017.

TSCHIRLEY, D.; ABDULA, D. Toward improved marketing and trade policies to promote household food security in central and southern Mozambique: Update. Research Paper Series No. 62E, 2007.

TURNER, N.W. *et al.* Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009 and 2014). **Analytica Chimica Acta**, v. 901, n.1. p. 12-33, 2015.

UE. Legislação da União Europeia: Regulamento (UE) 2021/1399 da Comissão de Agosto de 2021. Disponível em: <<https://www.lamic.ufsm.br/site/legislacoes/legislacao-da-uniao-europeia>>. Acesso em: 13 mar, 2023.

UENG, Y. F. *et al.* Oxidation of Aflatoxin Bi by Bacterial Recombinant Human Cytochrome P450 Enzymes. **In Chem. Res. Toxicol**, v. 8, n. 1, p. 218-225, 1995.

USAID. Avaliação dos entraves das políticas comerciais sanitárias e fitossanitárias (sps) dentro das cadeias de valor de milho, soja e amendoim na África Austral. Disponível em: <https://www.marketlinks.org/sites/default/files/resource/files/LEO20Resumo20320Necrose20Letal20do20Milho2028NLM2920e20Micotoxinas20Um20Papel20Na20Indc3bastia20de20Sementes.pdf>. Acesso em: 29 Mar. 2023.

VAN RENSBURG, S. J. *et al.* Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. **Br. J. Cancer**, v. 51, p. 713–726, 1985.

VARGAS, E. A.; PREIS, L. C.; SILVA, M. G. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 n Brazilian corn. **Food and Additives and Contaminants**, v. 10, n. 11, p. 981-986, 2001.

VILLERS, P. Aflatoxins and safe storage. **Front Microbiology**, v. 5, n. 158, p. 1-6, 2014.

WACOO, A.P. *et al.* Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. **Journal of Applied Chemistry**, v. 23, n., 2014.

WARTH, B. *et al.* Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. **J. Agric. Food Chem**, v. 60 n. 1, p. 9352–9363, 2012.

WEBB, P. *et al.* Hunger and malnutrition in the 21st century. *BMJ (Clinical research ed.)*, 361, k2238. 2018. DOI:10.1136/bmj.k2238;

WILLIAMS, J. H. *et al.* Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 5, p. 1106-1122, 2004.

WOGAN, G. N.; KENSLER, T. W.; GROOPMAN, J. D. Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. A review. **Food additives & contaminants: part A**, v. 29, n.2, p. 249–257, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Aflatoxinas: Resumen sobre inocuidad de los alimentos**. Fevereiro de 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety>> Acesso em: 09.10.2022

Xiulan, S. *et al.* Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 185–194, 2005.

YUN GONG, Y. *et al.* Aflatoxin Exposure May Contribute to Chronic Hepatomegaly in Kenyan School Children. **Environmental Health Perspectives**. v. 120, n. 6, 2012.

ZHAO, L. *et al.* Occurrence of Aflatoxin B1, deoxynivalenol and zearalenone in feeds in China during 2018–2020. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2021.

ZUMMO, N.; SCOTT, GE. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. **Plant Disease**, v.76, n.1, p. 771-773, 1992.

Capítulo II

Manuscrito: OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ E G₂ NA FARINHA DE MILHO PRODUZIDA EM NAMPULA, MOÇAMBIQUE, E SUA AVALIAÇÃO DE RISCO CARCINOGÊNICO

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ E G₂ NA FARINHA DE MILHO PRODUZIDA EM NAMPULA, MOÇAMBIQUE, E SUA AVALIAÇÃO DE RISCO CARCINOGENICO

Martinho Gamas Dinis Martinho^a, José Antônio Menezes-Filho^{a,b,c}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFBA;

^b Programa de Graduação em Farmácia, Faculdade de Farmácia, UFBA

^c Laboratório de Toxicologia Clínica, Faculdade de Farmácia, UFBA

Periódico a ser submetido (1ª submissão):	<i>Journal of Food Composition and Analysis e ISSN 10960481, 08891575</i>
Maior percentil (Scopus):	https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=20582&tip=sid&clean=0
Periódico a ser submetido (2ª submissão):	<i>Food Additives and Contaminants: Part B, ISSN 19393210, 19393229</i>
Maior percentil (Scopus):	https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19400157146&tip=sid&clean=0

***Corresponding author:** José Antônio Menezes-Filho, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. Rua Barão de Jeremoabo 137. Campus Universitário de Ondina. Salvador, Bahia. Zip-code: 40170-115. Brazil. E-mail: antomen@ufba.br

Resumo

Introdução: As aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) são compostos de bisfuranocumarinas produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em países de clima quente e úmido. Estas podem contaminar cereais, incluindo o milho que é a base da dieta em países africanos, como Moçambique. As aflatoxinas causam sérios problemas na saúde humana e animal. Na África Subsaariana (ASS), as estimativas de exposição dietética às aflatoxinas superam a 100 ng/kg pc/dia. A incidência de câncer hepatocelular (CHC) é de 46.000/ano. Moçambique tem a maior taxa de CHC do mundo. **Objetivos:** Verificar a ocorrência das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 na farinha de milho produzida e comercializada em Moçambique no período de Janeiro a Março de 2022 e avaliar o risco carcinogênico devido ao seu consumo. **Metodologia:** As amostras de farinha de milho ($n=30$) produzidas e comercializadas na cidade de Nampula, Moçambique, foram coletadas em cinco fábricas processadoras de farinhas. A determinação de umidade das farinhas foi realizada segundo métodos oficiais proposto pelo Instituto Adolfo Lutz. Os teores de aflatoxinas foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de fluorescência após extração em colunas de imunoafinidade e derivatização com ácido trifluoroacético. Para adaptação e validação da metodologia analítica fez-se necessário a realização de testes de linearidade, seletividade, sensibilidade (limite de detecção e de quantificação), precisão (coeficiente de variação em %) e exatidão (recuperação em %) como parâmetros de avaliação de desempenho do método. A ingestão diária de AFs pela população moçambicana foi estimada de acordo com o peso médio da população adulta e a estimativa de consumo *per capita* da farinha de milho. A avaliação de risco carcinogênico foi baseada no cálculo da Margem de Exposição (MOE) para dois cenários distintos: homens e mulheres adultos. **Resultados:** A média da umidade nas amostras coletadas foi $10,5\% \pm 0,79$, variando de 9,1% a 12,2%. As aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 foram detectadas em 20% das amostras ($n=6$), sendo que em 23,3% ($n=7$) delas tiveram contaminação de pelo menos duas ou três das aflatoxinas. Em 56,7% ($n=17$), das amostras não foram detectadas AFs. A contaminação por AFB_1 variou de 0,27 a $0,36 \mu\text{g.kg}^{-1}$, e os teores de aflatoxinas totais variaram de 0,1 e $1,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$, com média de $0,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ estando abaixo dos LMT ($10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$) para Moçambique e União Europeia, respectivamente. A MOE calculada para homens foi de 243 e para mulheres de 231, estando, portanto, muitas vezes abaixo do ponto de corte de risco negligenciável que é 10.000. **Conclusões:** Diante do exposto, o consumo da farinha de milho em Nampula, Moçambique, representa um risco potencial de carcinoma hepatocelular (CHC)

pela exposição às aflatoxinas, devido ao alto consumo deste produto alimentício que é a base da dieta na maioria dos países africanos.

Palavras-chave: Micotoxinas. Produtos a base de milho. Avaliação de risco. Moçambique. Segurança Alimentar.

OCCURRENCE OF AFLATOXINS B₁, B₂, G₁ AND G₂ IN MAIZE FLOUR PRODUCED IN NAMPULA, MOZAMBIQUE AND THEIR CARCINOGENIC RISK ASSESSMENT

Abstract

Introduction: Aflatoxins (B₁, B₂, G₁ and G₂) are bisfuranocoumarin compounds produced by the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in countries with hot and humid climates. These can contaminate cereals, including maize which is a staple diet in African countries such as Mozambique. Aflatoxins cause serious problems in human and animal health. In Sub-Saharan Africa (SSA), estimates of dietary exposure to aflatoxins exceed 100 ng/kg bw/day. The incidence of hepatocellular cancer (HCC) is 46.000/year. Mozambique has the highest rate of HCC in the world. Objectives: To verify the occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in maize flour produced and commercialized in Nampula, Mozambique, from January to March 2022 and evaluate the carcinogenic risk due to its consumption. **Methodology:** Maize flour samples (n=30) produced and commercialized in Nampula, Mozambique, were collected from five flour processing factories. Humidity determination of the flours was performed according to official methods proposed by the Adolfo Lutz Institute. Aflatoxin levels were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Fluorescence Detector after extraction on immunoaffinity columns and derivatization with trifluoroacetic acid. For the adaptation and validation of the analytical methodology, it was necessary to perform linearity, selectivity, sensitivity (detection and quantification limit), precision (coefficient of variation in %) and accuracy (recovery in %) tests as parameters to evaluate the performance of the method. The daily intake of AFs by the Mozambican population was estimated according to the average weight of the adult population and the estimated per capita consumption of maize flour. Carcinogenic risk assessment was based on the calculation of the Margin of Exposure (MOE) for two distinct scenarios: adult men and women. **Results:** The mean humidity in the collected samples was 10.5% ± 0.79, ranging from 9.1% to 12.2%. Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ were detected in 20% of the samples (n=6), and in 23.3% (n=7)

of them had contamination of at least two or three of the aflatoxins. In 56.7% (n=17), of the samples no AFs were detected. The contamination of AFB₁ ranged from 0.27 to 0.36 ug.kg⁻¹, and the levels of total aflatoxins ranged from 0.1 and 1.0 ug.kg⁻¹, with a mean of 0.8 ug.kg⁻¹ being below the MRLs (10 ug.kg⁻¹ and 4 ug.kg⁻¹) for Mozambique and the European Union, respectively. The calculated MOE for men was 243 and for women 231, thus being several folds below the negligible risk cutoff point which is 10,000. **Conclusions:** Thus, the consumption of maize flour in Nampula, Mozambique, poses a potential risk of hepatocellular carcinoma (HCC) from aflatoxin exposure, due to the high consumption rate of this food product that is a staple diet in most African countries.

Keywords: Mycotoxins. Maize products. Risk assessment. Mozambique. Food security.

1. Introdução

As aflatoxinas (AFs) B₁, B₂, G₁ e G₂ são compostos de bisfuranocumarinas produzidos naturalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (EFSA, 2019), especialmente sob clima quente e alta umidade (Villers, 2014). Estas micotoxinas são mutagênicas e carcinogênicas tanto para humanos como para animais (William et al., 2010). Por isso que a contaminação de alimentos por estas substâncias é um grave problema de saúde pública (ROCHA et al., 2023).

Na África Subsaariana (ASS) a estimativa de exposição dietética às aflatoxinas superam a 100 ng/kg pc/dia (WHO, 2018). Nesta região foi observada uma incidência de câncer hepatocelular (CHC) de 46.000 casos/ano, com ocorrências padronizadas por idade de até 41,2 casos/100.000 habitantes a cada ano (El-KASSAS; ELBADRY, 2022). A incidência de câncer hepatocelular (CHC) em Moçambique relacionada à ingestão de AFB₁ e excluídas outras causas foi de 17,7 casos/100,000 habitantes, sendo considerada a maior taxa de CHC do mundo e afeta mais homens do que mulheres (WHO, 2018; El-KASSAS; ELBADRY, 2022).

Estudos realizados em Moçambique entre 1980 e 2018 quantificaram aflatoxinas em vários tipos de amostras, porém, há divergências entre os estudos quanto a coleta e métodos analíticos. A maioria destes estudos não realizou a distinção entre os tipos de aflatoxinas detectadas (CASADEI, 1980; VAN RENSBURG et al., 1985; AUGUSTO et al., 2014; CAMBAZA et al., 2018).

Moçambique faz parte dos 15 países africanos que em 2003 apresentaram regulamentos específicos para micotoxinas, publicados pela *Food and Agricultural Organization* (FAO). Assim, a nível nacional, o limite máximo aceitável para aflatoxinas totais no milho e amendoim destinados ao consumo humano é de $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (FAO, 2003). Devido ao alto consumo de milho e seus derivados em Moçambique, é necessário caracterizar o risco de exposição às aflatoxinas. A caracterização do risco é feita de acordo com o ALARA (As Low As Reasonably Achievable) e por meio do cálculo da margem de exposição - MOE (EFSA, 2020, 2005).

Em Moçambique poucos estudos existem sobre situação fitossanitária, condições de coleta, teor de umidade, condições de armazenamento e processamento dos produtos agrícolas comercializados pelo setor empresarial e familiar, principalmente nos derivados de milho em relação à contaminação por aflatoxinas. Este estudo visa investigar a ocorrência das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, e proceder a avaliação de risco carcinogênico decorrente do consumo da farinha de milho pela população adulta moçambicana.

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostragem

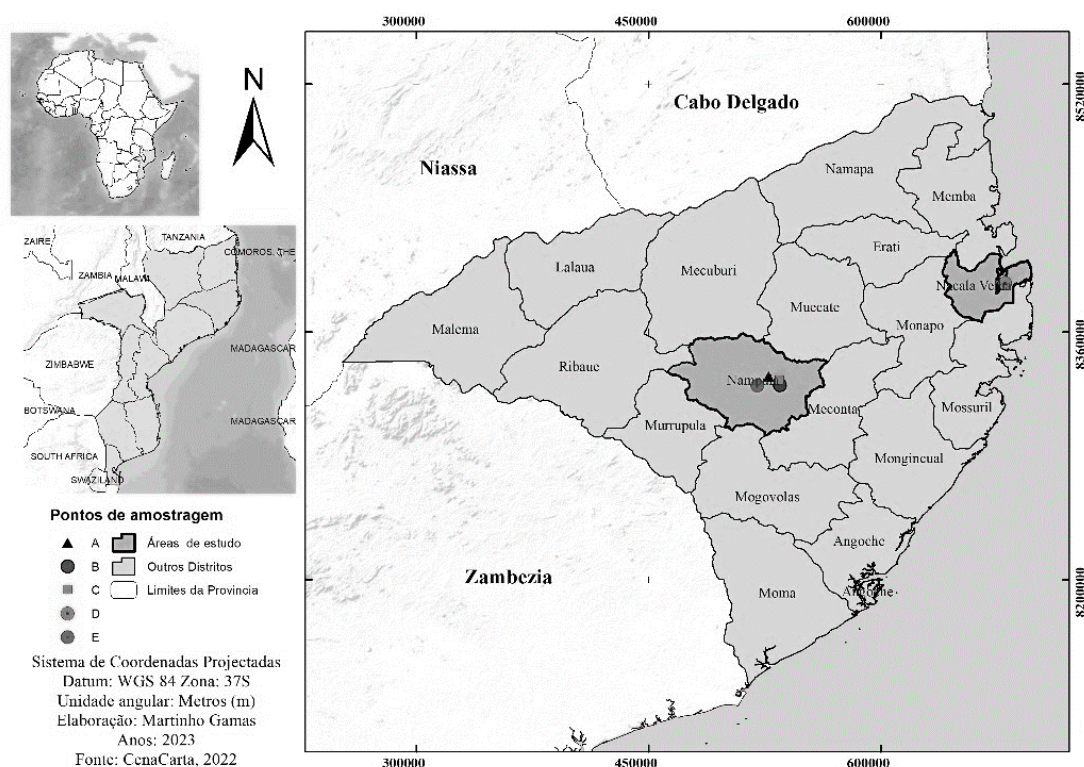
As amostras de farinha de milho foram coletadas em cinco fábricas de processamento de farinha de milho localizadas na cidade de Nampula, Moçambique, entre os meses de janeiro e março de 2022. As fábricas foram selecionadas de acordo com os critérios de classificação da DPIC (Direção Provincial da Indústria e Comércio de Nampula), a entidade que supervisiona a área de indústria e comércio em nível provincial. Com base nos dados da DPIC, as fábricas foram selecionadas por serem consideradas de grande escala por conta do seu elevado potencial de produção da farinha a abastecimento no mercado local. Assim, após a obtenção da lista das fábricas consideradas de grande escala, foram selecionadas utilizando um método aleatório simples cinco fábricas e identificadas como A, B, C, D e E. Todas as fábricas estão localizadas na Província de Nampula onde uma localiza-se no Município de Nacala-Porto e três no município de Nampula. A Figura 1 mostra os locais onde as amostras foram coletadas na cidade de Nampula.

2.1.1 Coleta da amostra

O processo de coleta decorreu em três momentos identificados como momento 1, 2 e 3, onde houve intervalo de vinte dias entre os momentos de coleta. As amostras foram coletadas diretamente das fábricas selecionadas e do local de ensacamento da farinha, com um intervalo de cinco minutos entre as coletas. Os procedimentos da coleta foram realizados segundo

métodos de amostragem e análise para o controle dos níveis de aflatoxinas, dispostas da RDC nº 274 de 15 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002), que estabelece os métodos de amostragem e análise para o controle dos níveis de micotoxinas em grãos e seus derivados, prevê que a amostragem pode ser realizada nas extremidades de uma esteira ou no ponto de saída dos grãos.

Figura 1 – Mapeamento das fábricas onde foram coletadas as amostras de farinha de milho.



As amostras foram colocadas em sacos plásticos de polietileno e embaladas em caixas térmicas. Foram coletadas 6 amostras em cada fábrica, o que totalizaram foram 30 trinta amostras de farinha de milho com peso mínimo de 100 g cada. As amostras embaladas foram devidamente etiquetadas com dados referentes ao código da amostra, número da coleta, hora da coleta e data. Elas foram transportadas do local de coleta em caixas térmicas para o Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar da Universidade Lúrio e armazenadas a -18°C até o momento do transporte para Salvador, Bahia, Brasil, sendo armazenadas em um freezer (-22°C). As análises das amostras foram realizadas no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. Também foi aplicado um questionário aos fabricantes, com o objetivo de conhecer a origem dos grãos de milho e as condições de manuseio do grão durante seu processamento.

2.2 Materiais e reagentes

Os reagentes e materiais usados foram: água ultrapura (Tipo I purificada no sistema Milli-Q® da Merck/Millipore); metanol e acetonitrila grau HPLC; fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) grau P.A. (Sigma Aldrich, EUA); fosfato de sódio di-básico (Na_2HPO_4) grau P.A. (Vetec, Brasil); cloreto de sódio (NaCl) e ácido trifluoroacético (TFA) da Merck (Lichrosolv, Alemanha); n-Hexano grau HPLC (Merck, Alemanha); membrana filtrante de Nylon 0,45 μm (Millipore, Brasil); coluna de imunoafinidade (AflaTest WB, VicamInc, Watertown, EUA) e ácido fosfórico (Vetec, Brasil). Uma solução padrão certificada foi usada em concentrações de $1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para AFB_1 e AFG_1 e $0,3 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para AFB_2 e AFG_2 (Supelco Analytical, EUA).

Os equipamentos utilizados nos experimentos foram: pipetas automáticas devidamente calibradas, homogeneizador TE-645 da TECNAL; banho ultrassônico com termostato (Elma, Elmasonic, Alemanha); Vortex (modelo AP 56, Phoenix, Brasil); sistema de extração em fase sólida VacElut (Varian, estado, EUA); sistema de cromatografia líquida de alta eficiência modelo 1260 Infinity (Agilent Technologies, EUA) e detector de fluorescência série 200 (Perkin Elmer, EUA). A coluna cromatográfica usada foi a Zorbax Eclipse XDB Rapid Resolution, $150 \times 4,6 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$ (Agilent, EUA).

2.3 Determinação da umidade da farinha de milho

Para a análise de umidade, dois gramas da amostra foram pesados em uma cápsula de porcelana previamente seca e tarada. A cápsula foi colocada em uma estufa a 105°C até atingir massa constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Ela foi deixada resfriar em um dessecador com sílica gel até a temperatura ambiente, e a amostra foi pesada. O cálculo foi baseado na Equação 1.

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

m_i = massa inicial da amostra (g)

m_f = massa final da amostra (g)

2.4 Preparo das amostras

As amostras foram homogeneizadas nas embalagens, e porções delas foram retiradas por quarteamento imaginários. Em seguida, cerca de 25 g da amostra foram pesados e transferidos para um béquer em uma balança analítica calibrada. A amostra pesada foi transferida para o homogeneizador. Em seguida, 100 mL da solução de extração Acetonitrila:

Água ultrapura (84:16 v,v) foram adicionados e agitados por três minutos a 800 r.p.m. O extrato foi filtrado com papel de filtro Whatman nº 4 diretamente em um tubo de 20 mL com tampa de rosca. As amostras foram filtradas e armazenadas na geladeira (4°C) até a próxima etapa. A preparação das amostras foi realizada de acordo com os estudos de Castro *et al.* (2013).

2.5 Extração e purificação

A extração foi realizada com base nos estudos desenvolvidos por Maciel *et al.* (2017) e no Manual de Aflatest WB (Vicom, EUA). A extração e a purificação das aflatoxinas foram realizadas em uma coluna de imunoafinidade acoplada ao sistema VacElut. As colunas foram condicionadas com 10 mL de tampão fosfato (pH 7,2) e, em seguida, a coluna foi carregada com uma alíquota de 5 mL de extrato. Permitiu-se que o extrato percolasse a uma taxa de fluxo de 1 a 2 gotas por segundo. As colunas foram lavadas com 10 mL de água ultrapura e, em seguida, a eluição foi realizada com 1,5 mL de metanol com taxa de fluxo de 1 a 2 gotas por segundo, coletando-se o eluato em tubos de 5 mL. O solvente foi evaporado sob um fluxo suave de nitrogênio a 40°C.

2.6 Derivatização e análise cromatográfica

O detector de fluorescência pode analisar somente as moléculas que emitem fluorescência. As aflatoxinas são naturalmente fluorescentes, sendo que B₂ e G₂ têm forte intensidade, enquanto B₁ e G₁ têm intensidades discretas. Para obter melhores limites de detecção, recomenda-se realizar uma reação de derivatização, transformando-as em seus derivados hemiacetais altamente fluorescentes, facilitando assim suas detecções (JAIMEZ *et al.*, 2000; ARROYO-MANZANARES *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2019).

Portanto, a reação de derivatização pré-coluna foi realizada adicionando 200 µL de n-hexano e 50 µL de ácido trifluoracético (TFA) ao extrato seco e agitando em um vórtex por 30 segundos. A reação ocorreu sob proteção da luz por 30 minutos em um banho-maria (40 °C). Em seguida, o solvente foi evaporado sob suave jato de nitrogênio em banho-maria a 40 °C e, por fim, o extrato seco foi ressuspenso com 500 µL de metanol, agitando em um vórtex por 30 segundos. O extrato foi filtrado diretamente para frascos âmbar do amostrador automático de HPLC previamente identificado, com auxílio de filtros de Nylon de 0,45 µm acoplados a ponteira.

A análise cromatográfica foi realizada no modo de eluição isocrática com a fase móvel água: metanol: acetonitrila (55:33:12, v/v/v). A taxa de fluxo utilizada foi de 0,8 mL.min⁻¹ e o volume de injeção foi de 10 µL. O detector de fluorescência foi ajustado para comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 e 455 nm, respectivamente (MACIEL *et al.*, 2017), e cada amostra foi injetada em triplicata.

2.7 Calibração

Os pontos da curva de calibração foram feitos em cinco frascos volumétricos de 10 mL previamente identificados e já contendo um determinado teor de água ultrapura, e foram adicionados 10, 25, 50, 100 e 200 µL da solução estoque Aflatoxin Mix (1.000 µg.kg⁻¹), respectivamente, e completados até o menisco com água ultrapura. Para o branco, foi usada água ultrapura. Cada solução padrão foi injetada no HPLC em triplicata para obter várias áreas de pico. Assim, foi possível construir a curva de calibração em triplicata com seis níveis de concentração: 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µg.kg⁻¹ para AFG₁ e AFB₁ e 0,3; 0,75; 1,5; 3,0; 5,0 µg.kg⁻¹ para AFB₂ e AFG₂, incluindo o branco. Esses calibradores foram submetidos aos procedimentos de extração, purificação em colunas de imunoafinidade, evaporação do solvente e derivatização pré-coluna. Esse parâmetro pode ser verificado por meio da linha de calibração de aflatoxinas visualizada na figura 3 e do valor do coeficiente de determinação obtido.

As concentrações das aflatoxinas das amostras de farinha de milho foram calculadas com base na equação proposta por Rahayu *et al.* (2020), em que o valor de AFs (µg.kg⁻¹) obtido por meio dos padrões da curva de calibração foi multiplicado pelo volume total extraído (mL) e dividido pela massa pesada (g), conforme ilustrado na equação 2 abaixo.

$$AFs(\mu\text{g/kg}) = \frac{[\text{Concentração } (\mu\text{g.kg}^{-1}) \text{ nos padrões da curva} \times \text{volume total extraído (mL)}]}{\text{Massa ponderada (25 g)}} \quad (2)$$

2.8 Validação Analítica

A metodologia analítica foi adaptada seguindo as recomendações estabelecidas nas diretrizes das autoridades regulatórias nacionais DOC - CGCRE - 008 (2016) do INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) e RDC nº 166 da ANVISA (2017). Foram realizados os estudos de linearidade, sensibilidade - limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), precisão (reprodutibilidade intra e interdiária) e exatidão (recuperação).

2.9 Tratamento estatístico

Os valores de umidade foram descritos como média e desvio padrão. Os teores de aflatoxina na amostra em valores traços foram convencionalmente registrados como LD/2. Essa estimativa é uma recomendação do Sistema de Monitoramento Ambiental Global - Programa de Monitoramento e Avaliação da Contaminação de Alimentos (GEMS/Food) (OMS, 1995). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para avaliar a normalidade da distribuição dos teores de umidade e aflatoxina nas amostras de farinha de milho selecionadas. O teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi aplicado para verificar as diferenças de teor de aflatoxina de acordo

com o período de amostragem. O tratamento estatístico foi realizado com o *software* IBM Statistics SPSS v. 25 (IBM Corporation, EUA) e a probabilidade de 0,05 foi usada como limite de significância estatística.

2.10 Avaliação de risco carcinogênico

A avaliação de risco foi realizada para verificar a probabilidade de efeitos adversos à saúde devido ao consumo de farinha de milho contaminada por aflatoxinas. A ingestão diária foi estimada de acordo com a seguinte equação (JARDIM; CALDAS, 2009):

$$ID = \frac{C*Q}{PC} \quad (3)$$

Onde:

ID: ingestão diária ($\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ de peso corporal/dia);

C: concentração de AFs encontrada na amostra analisada ($\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$);

Q: Ingestão diária média em g *per capita*;

PC: peso corporal individual (Kg de peso corporal).

O consumo médio de farinha de milho em Moçambique foi obtido em um estudo sobre a produção global de milho por Ranun *et al.* (2014) no qual foi estimado em 116 g/per capita/dia. O peso médio corporal, utilizado para estimar a ingestão diária de AFs e, consequentemente avaliação de risco de população adulta foi de 59,2 kg e 56,2 kg, respectivamente para homens e mulheres (NCD RISK FACTOR, 2023).

A caracterização do risco foi feita por meio do cálculo da MOE (margem de exposição), uma estimativa obtida pelo cálculo da razão entre a dose de referência toxicológica e os níveis de ingestão diária estimados. O efeito central na determinação da referência toxicológica para aflatoxinas é a carcinogenicidade (SCHRENK, 2020). O Painel CONTAM selecionou um limite de confiança inferior de dose de referência (BMDL) para uma resposta de referência de 10% de $0,4 \mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ de peso corporal (bw) por dia para a incidência de CHC em ratos machos após a exposição ao AFB₁ a ser usado em uma abordagem da MOE.. Esse valor pode ser usado como referência toxicológica para aflatoxinas totais (EFSA, 2020). A equação da MOE é apresentada abaixo:

$$MOE = \frac{BMDL10}{ID} \quad (4)$$

Onde:

MOE: Margem de exposição.

BMDL₁₀: Limite de confiança inferior da dose de referência para uma resposta de referência de 10% ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de pc/dia).

ID: Ingestão diária ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de pc/dia).

Levando em conta as diferenças anatômicas e de composição corporal entre homens e mulheres, além do consumo médio de alimentos, as MOEs foram estimadas em dois cenários: C1 para homens e C2 para mulheres.

3. Resultados e Discussão

As informações obtidas nos questionários aplicados nas fábricas mostraram que o milho era proveniente dos distritos de Lichinga, Cuamba, Milange, Gurué, Mocuba e Malema (distritos pertencentes às províncias de Niassa, Zambézia e Nampula) em Moçambique. Nas fábricas A, C, D e E o transporte de grãos de milho do campo para a fábrica foi feito em veículos fechados, enquanto a fábrica B reportava o uso de um veículo aberto. Entretanto, somente as fábricas C, D e E garantem a desinfecção prévia dos veículos antes de carregar os grãos. As substâncias mais utilizadas nesse processo foram o Falfume 57% ft Snowthon 500 EC nas fábricas C e D; na fábrica E o clorpirifós. O controle de qualidade dos grãos recebidos era realizado pela pré-seleção ou classificação dos grãos (quebrados, germinados, entre outros). Todos os fabricantes desinfetam seus armazéns, e as substâncias mais utilizadas são Falfaume 57% ft Snowthon 500 EC, Fosfato de alumínio e Cipermetrina. Com exceção da fábrica A, as demais realizam controle regular de temperatura.

Todos os fabricantes realizam o controle de gorgulhos e insetos, bem como o controle de doenças dos grãos, e os armazéns são bem ventilados. Eles também controlam a umidade do grão de milho durante o processamento e em todo o processo de produção da farinha. Nenhum fabricante realiza o controle da presença de fungos ou aflatoxinas nas matérias-primas e, quando questionados sobre os motivos, o fabricante A mencionou "que nenhum outro fabricante realiza esses testes", o fabricante E disse que "em algum momento o fez" e os demais fabricantes afirmam que não é prioridade realizar esses testes.

O período médio de armazenamento do grão foi variável, com os fabricantes A, B, C e D afirmando que foi de 3 a 6 meses, e o fabricante E afirmou que foi inferior a três meses. As

condições físicas das instalações e dos equipamentos das fábricas A, C e E foram consideradas satisfatórias, ou seja, boas, o que não foi observado nas fábricas B e D.

3.1 Umidade

Um alto teor de umidade no milho armazenado ou no produto acabado leva à proliferação de fungos que, durante seu metabolismo, liberam metabólitos secundários conhecidos como aflatoxinas, que são extremamente tóxicas e carcinogênicas, sendo o principal grupo de toxinas, e a intoxicação por essas toxinas é chamada de aflatoxicose (ALMEIDA *et al.*, 2017). A Tabela 1 mostra os valores médios de umidade da farinha em cada momento de coleta.

Tabela 1 – Teor de Umidade encontrado para cada momento de coleta de farinha de milho por Indústria

Indústrias Selecionadas	Momento de coleta	Umidade (%) $\pm$ DP
A	1	11,08 $\pm$ 0,18
	2	10,25 $\pm$ 0,11
	3	11,36 $\pm$ 0,05
B	1	10,75 $\pm$ 0,03
	2	10,53 $\pm$ 0,24
	3	9,62 $\pm$ 0,09
C	1	11,85 $\pm$ 0,42
	2	10,75 $\pm$ 0,64
	3	11,23 $\pm$ 0,09
D	1	10,12 $\pm$ 0,13
	2	9,91 $\pm$ 0,08
	3	11,21 $\pm$ 0,07
E	1	9,31 $\pm$ 0,13
	2	9,19 $\pm$ 0,17
	3	10,49 $\pm$ 0,74

*Valores referentes à média de triplicatas, DP: Desvio padrão.

Todas as amostras estão dentro dos padrões estabelecidos pela especificação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela norma moçambicana onde, o grão de milho e a farinha de milho devem conter uma porcentagem de umidade em sua composição de no máximo 15% e 14%, respectivamente (INNOQ 2017; ANVISA, 2022), para melhor estabilidade durante o armazenamento desse produto. De acordo com Leeson *et al.* (1995), para

o crescimento de fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* e a produção de aflatoxinas, a condição ideal é que o teor de umidade dos grãos de milho seja de 17%.

O controle de umidade em grãos e derivados tem como principal objetivo o controle da proliferação de fungos em grãos armazenados, para evitar a rápida deterioração e prolongar a vida de prateleira desses produtos que serão comercializados. Para isso, é necessário que o armazenamento seja precedido de cuidados durante os processos de colheita, limpeza e secagem dos grãos, além da posterior desinfecção dos silos e equipamentos, com rigoroso controle de qualidade incluindo a determinação da umidade antes e depois do processamento (DOMENICO *et al.*, 2015).

Neste estudo, 100% das amostras apresentaram teor percentual de umidade dentro dos padrões estabelecidos e a média foi de $10,5\% \pm 0,79$, variando de 9,1% a 12,2%. Resultados semelhantes foram encontrados por Domenico *et al.* (2015), onde a umidade do grão de milho variou de 11,12 a 14,61%. Já no estudo de Almeida *et al.* (2017) amostras de farinha de milho em flocos de três fabricantes apresentaram umidade acima do padrão estabelecido, enquanto de dois fabricantes estavam em conformidade. Esses resultados podem estar relacionados com os cuidados durante o processamento que as fábricas de farinha de milho na cidade de Nampula oferecem. Todas as fábricas do presente estudo afirmaram realizar o teste de umidade do grão de milho durante o processamento e ao longo do processo de produção da farinha. Outro detalhe encontrado foi que, durante o processo de moagem do milho, três fábricas de farinha afirmaram não adicionam água durante o processamento enquanto e outros adicionam. Esses cuidados e outros evidenciados neste estudo podem ter alguma influência no resultado final de umidade no produto final. Segundo Almeida *et al.* (2017), um controle eficiente da proliferação de fungos em grãos evita a contaminação desse alimento, por isso é de extrema importância que seja precedido de cuidados durante o processo de colheita, limpeza, secagem dos grãos e desinfecção dos locais e equipamentos de armazenamento.

3.2 Validação analítica

A estratégia para garantia de qualidade da análise de determinação da AFs na amostra farinha de milho foi validar totalmente o método HPLC selecionado após a extração usando colunas SPE de imunoafinidade. Os principais resultados do método validado estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados quantitativos da validação analítica do método para determinação de aflatoxinas em farinha de milho.

Parâmetros	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Linearidade (R ^{2a})	0,993	0,994	0,992	0,998
Sensibilidade				
LD (µg.kg ⁻¹) ^b	0,25	0,0045	0,25	0,001
LQ (µg.kg ⁻¹) ^c	0,83	0,015	0,83	0,004
Precisão (CV %) ^d	2,9	1,3	3,2	1,0
Exatidão (Recuperação %)	95,0	87,0	95,0	98,0

a. Coeficiente de determinação; b. Limite de detecção; c. Limite de quantificação; d. Coeficiente de variação

3.2.1 Precisão e exatidão

Inicialmente, foi realizada a extração de três replicatas da amostra de farinha de milho pura e de outras três fortificadas, com adição de aflatoxinas. Após a extração e limpeza pelo método SPE, as amostras foram derivatizadas e injetadas no cromatógrafo. O cálculo da precisão foi feito, utilizando-se o coeficiente de variação (CV%) conforme ilustrado na tabela 2. De acordo com o DOC-CGCRE-008 (INMETRO, 2016), o critério para aceitação da repetitividade para o nível de concentração da faixa de trabalho deste estudo (em µg.kg⁻¹) é de até 20%. Os valores de repetitividade intracorridas de todas as AFs variaram de 1,0 a 3,2%. Assim sendo, o método adaptado de Rocha *et al.* (2023), apresentou resultados satisfatórios de reprodutibilidade.

De acordo com a INMETRO, a recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações (baixa, média e alta) da faixa de trabalho do método (INMETRO, 2016). Neste estudo, a recuperação foi estimada pela análise de três replicatas de amostras fortificadas com concentração equivalente a máxima (19.76 µg.kg⁻¹) da faixa de trabalho do método. Por não existir material de referência certificado para cada aflatoxina analisada, foi fortificado com quantidade de aflatoxinas totais, porém, a partir desta, foi possível estimar a quantidade para cada aflatoxina individualmente. Estas leituras foram feitas em triplicata e a recuperação foi calculada segundo a equação 3 abaixo.

$$R\% = \frac{|\text{valor obtido}|}{\text{valor esperado}} \times 100 \quad (4)$$

Os resultados da recuperação obtidos variaram entre 87 a 98%. O percentual de recuperação encontrou-se dentro da faixa recomendada (70 - 120%) pelo INMETRO (2016), indicando que o método de extração foi adequado para a quantificação das aflatoxinas na matriz de farinha de milho utilizada.

3.2.2 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da determinação da precisão dos tempos de retenção das 4 (quatro) aflatoxinas, comparando-se o resultado de amostras fortificadas com o padrão de aflatoxinas e amostras de farinha de milho naturalmente contaminadas. Os resultados podem ser visualizados na tabela 3 a seguir.

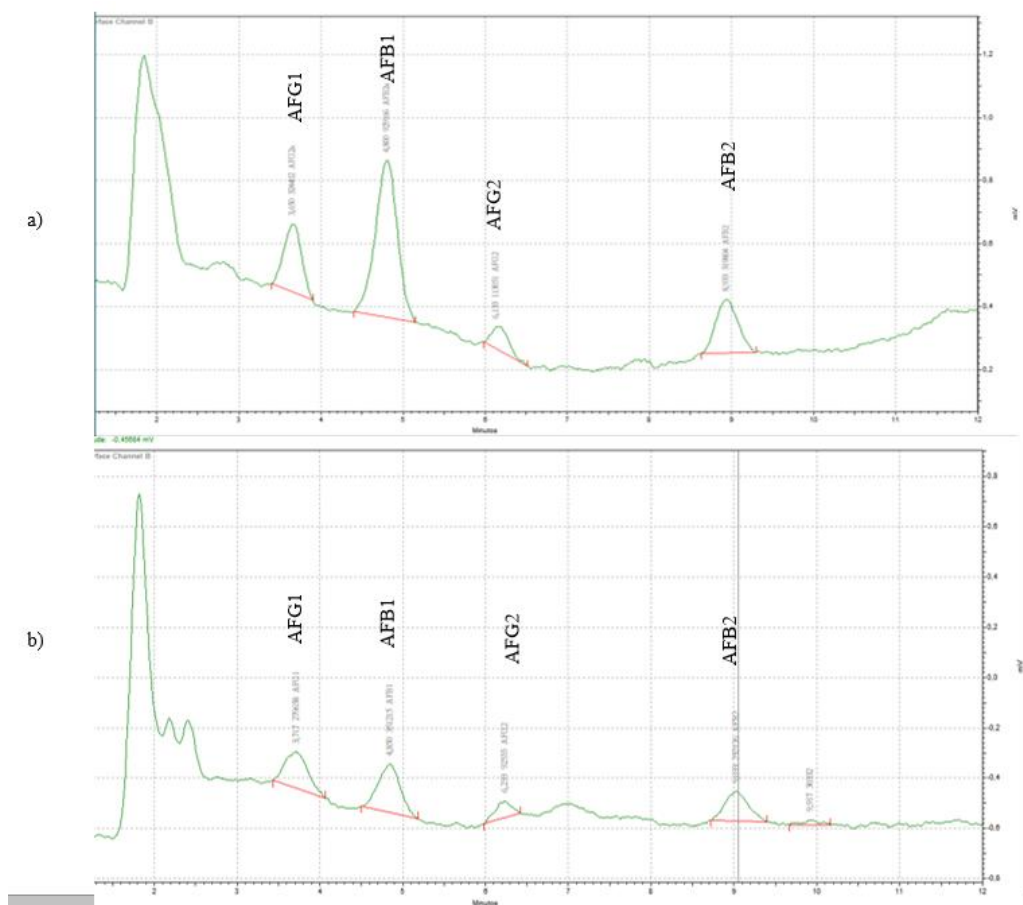
Tabela 3 – Tempos de retenção das aflatoxinas (min) em amostras de farinha fortificada e naturalmente contaminada

Aflatoxinas	Amostra Fortificada		Naturalmente Contaminada	
	Média	DPR (%)	Média	DPR (%)
AFB₁	4,8	1,5	4,9	0,6
AFB₂	8,9	0,1	9,0	2,1
AFG₁	3,6	1,3	3,8	0,9
AFG₂	6,0	1,3	6,2	1,6

DPR: Desvio padrão relativo

O tempo total da corrida foi de 12 minutos e a ordem de eluição das aflatoxinas por conta da mudança da polaridade após a derivatização foi a seguinte: AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂. Vale ressaltar, que as AFG₁ e AFB₁ são os respectivos derivados hemiacetais que usualmente na literatura científica têm sido reportadas com AFG_{2a} e AFB_{2a}. Na tabela 3 pode-se observar que houve uma grande similaridade entre os tempos de retenção da amostra fortificada e naturalmente contaminada. Os tempos de retenção apresentaram uma repetibilidade aceitável, para este nível de concentração (1,0 µg.kg⁻¹), pois foi inferior a 30% conforme do DOC-008 do INMETRO. Apesar da variabilidade do DPR entre a amostra fortificada e naturalmente contaminada, ambas tiveram uma boa precisão variando entre 0,1 a 1,5% para amostra fortificada e 0,6 a 2,1% para naturalmente contaminada. A figura 2 demonstra os cromatogramas das amostras de farinha de milho fortificada com mix do padrão de aflatoxinas e a outra naturalmente contaminada. A análise dos cromatogramas permite avaliar o aspecto qualitativo da seletividade do método.

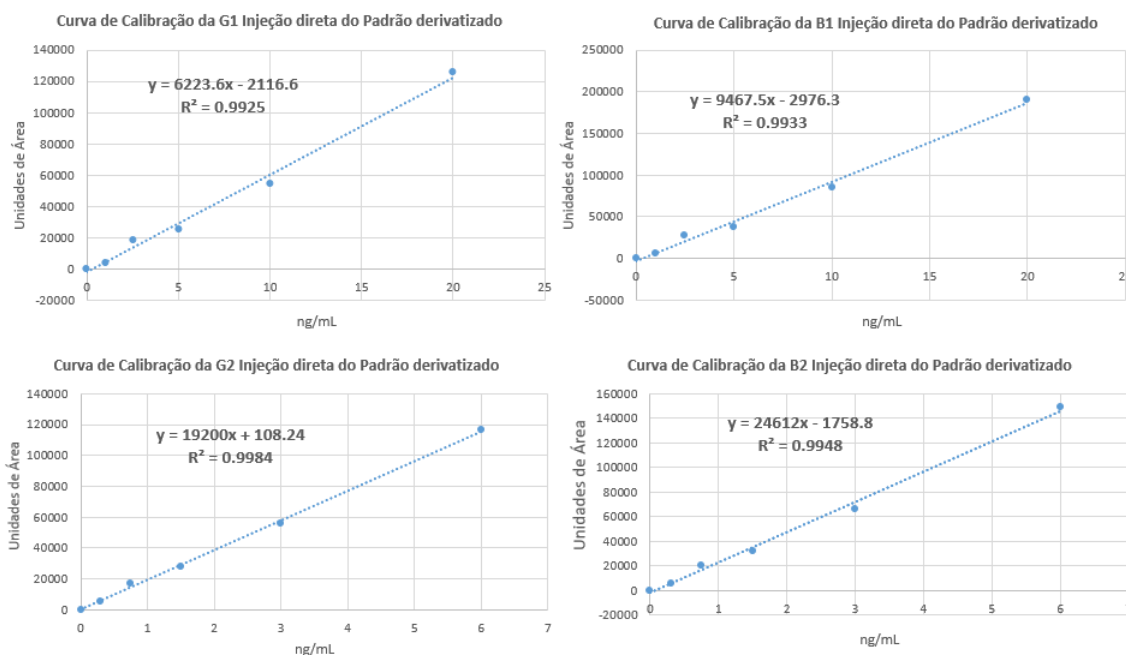
Figura 2 – Cromatogramas das aflatoxinas na farinha de milho: (a) amostra fortificada com 19,76 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ do mix de AFs e (b) amostra naturalmente contaminada.



3.2.3 Linearidade

A linha de tendência obtida para as quatro aflatoxinas confirma o comportamento linear da resposta do detector de fluorescência em função da concentração do analito conforme pode ser visto na figura 3. Assim, de acordo com RDC nº166 da ANVISA de 2017, o valor aceito para o coeficiente de determinação (r^2) deve ser igual a 0,99. Por outro lado, o INMETRO através DOQ-CGCRE-008 de 2018, recomenda um valor acima de 0,90. As soluções de calibração foram preparadas seguindo a mesma metodologia para o preparo das amostras de farinha de milho selecionadas. Em geral, os resultados obtidos neste estudo demonstram que o método tem linearidade aceitável de acordo com ANVISA, na qual o $r^2 > 0,99$ para todas as aflatoxinas estudadas.

Figura 3 – Curvas de calibração de padrão mix de aflatoxinas (G₁, B₁, G₂ e B₂) após derivatização.



3.2.4 Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Em geral 40% das amostras apresentaram os quatro tipos de aflatoxinas, porém abaixo de LQ. Com o intuito de evitar a interferência dessa ocorrência na determinação do LD e LQ. Para a determinação desses limites, foram realizadas injeções de uma série de soluções com concentração conhecida de aflatoxina até que a razão sinal/ruído (S/R) fosse de 3 para o cálculo do LD e de 10 para o cálculo de LQ (ROCHA *et al.*, 2023).

Tabela 4 – Determinação da sensibilidade do método através do método da razão Sinal-Ruído

Parametros	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
LD (µg.kg ⁻¹)	0,25	0,0045	0,25	0,001
LQ (µg.kg ⁻¹)	0,83	0,015	0,83	0,004

3.3. Ocorrência de aflatoxinas na farinha de milho

Os resultados das análises de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e de aflatoxinas totais (AFT) na farinha de milho oriundas de cinco fábricas codificadas de A a E revelaram que, do total de 30 amostras avaliadas, houve a quantificação de todas as aflatoxinas em 20% (n=6) de amostras. Por outro lado, 23,3% (n=7) das amostras tiveram contaminação de pelo menos duas ou três

aflatoxinas. Nas amostras restantes 56,7% (n=17) não foi possível quantificar as aflatoxinas, pois o teor de contaminação foi inferior ao limite estabelecido.

Tabela 5 – Ocorrência de aflatoxinas ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) nas amostras de farinha de milho coletadas em cinco fábricas processadoras de farinha de milho no período de Janeiro a Março de 2022

	Amostras positivas (%)	Média $\pm$ SD	Mediana	Intervalo
AFB₁	12 (40)	0,31 $\pm$ 0,03	0,30	0,25-0,33
AFB₂	12 (40)	0,21 $\pm$ 0,02	0,21	0,02-0,24
AFG₁	13 (43)	0,3 $\pm$ 0,02	0,31	0,27-0,36
AFG₂	7 (23)	0,07 $\pm$ 0,06	0,05	0,01-0,12
AFT^a	12 (40)	0,89 $\pm$ 0,08	0,87	0,55-1,05

AFT^a = AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂

O teste de K-S para normalidade da distribuição, aponta que os dados não seguem uma distribuição normal tanto para as AFT quanto para as AF individuais ($p < 0,001$). Foi utilizado o teste de Mann-Whitney U para verificar se houve diferença nos teores de AFs de acordo com o momento da coleta das amostras. A probabilidade observada foi maior que 0,05, portanto não houve diferença nos teores de AFs de acordo com o momento de amostragem.

Em Moçambique, a maioria dos trabalhos realizados sobre a ocorrência de aflatoxinas totais no milho e produtos a base de milho apresentaram percentuais de contaminação variáveis de 18,0 a 87,0% e níveis menores que o LD a $687,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (CASADEI, 1980; VAN RENSBURG *et al.*, 1985; WARTH *et al.*, 2012; AUGUSTO *et al.*, 2014). Neste presente estudo, obteve-se um percentual de ocorrência de aflatoxinas totais em 40% (n = 12) e com teores variando de 0,55 a $1,05 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Entretanto, poucos foram estudos feitos em Moçambique avaliaram individualmente as aflatoxinas, sendo que, Van Rensburg *et al.* (1985) nas suas amostram (n=2.183 refeições) tiveram resultados de aflatoxinas totais com predominância de 8,0% para AFB₁, seguida por 2,8% de AFB₂, 0,8% AFG₁ e 0,7% para AFG₂. Resultados diferentes foram achados por Nabwire *et al.* (2019), no qual houve contaminação em 100% (n=338) das amostras por aflatoxinas totais, com maior predominância de AFB₁ (97,1%), seguida da AFG₁, posterior AFB₂ e finalmente a AFG₂.

Nesta presente pesquisa, houve a presença AFG₁ 43%, seguida de AFB₁ e AFB₂ com 40% e por último de AFG₂ com 23% de contribuição em aflatoxinas totais. Porém, em termos de valores médios de cada aflatoxina houve maior contaminação de AFB₁ com $0,31 \mu\text{g.kg}^{-1}$,

seguida de AFG₁ 0,3 µg.kg⁻¹, AFB₂ 0,21 µg.kg⁻¹ e por último AFG₂ com 0,07 µg.kg⁻¹. Resultados semelhantes foram achados por Van Rensburg *et al.* (1985) que em todas suas amostras, a maior média de contaminação foi de AFB₁ 2,9 µg.kg⁻¹ e a menor foi para AFG₂ 0,03 µg.kg⁻¹. Outros resultados parcialmente semelhantes foram achados em um estudo que avaliou a presença de aflatoxinas em 13 amostras de milho triturados, destas 46% AFB₁, 46% AFG₁, 31% AFB₂ e 31% AFG₂ (WARTH *et al.*, 2012).

Estudos desenvolvidos em países africanos relatam altos níveis médios de contaminação por aflatoxinas no milho diferentemente dos achados nesta presente pesquisa. Casadai (1890); Van Rensburg *et al.* (1985); Augusto *et al.* (2014); e Ware *et al.* (2017). Nestes estudos, os teores médios de contaminação por aflatoxinas totais variaram de 3,25 a 183 µg.kg⁻¹. Resultados diferentes foram achados nesta pesquisa, em que o valor médio de contaminação para aflatoxinas totais foi de 0,8 µg.kg⁻¹ e estão abaixo do limite máximo tolerável (10 µg.kg⁻¹) para Moçambique. O mesmo foi evidenciado por Casadai (1890) e Van Rensburg *et al.* (1985) que tiveram médias da contaminação abaixo do limite máximo tolerável em Moçambique.

Neste estudo, boa parte das amostras analisadas foi detectada concentrações abaixo do LD. Resultados semelhantes foram achados nos USA por Zhang *et al.* (2018) e no Brasil por Mallman *et al.* (2020), ambos estudos avaliaram amostras de milho em que parte das amostras as aflatoxinas não foram detectadas e, das amostras detectadas, tiveram concentrações de aflatoxinas abaixo do LQ.

Estudos sugerem que o processamento dos alimentos pode reduzir os teores de micotoxinas nos produtos processados. Portanto, existe uma redução desta contaminação inicial durante o processamento (SCUDAMORE *et al.*, 2000). Assim, o processo de obtenção da farinha, entre outras etapas, envolve a redução do percentual de película (casca) do grão de milho, este procedimento tem influência no grau de branqueamento do produto final. De acordo com o Regulamento (EU) nº 165/2010, o arroz com casca contém frequentemente níveis de AFs ligeiramente superiores aos teores máximos permitidos. Contudo, após o branqueamento, processo que retira a casca, os teores de AF no arroz branqueado situam-se geralmente abaixo dos teores máximos (EC, 2010).

Quanto maior for a percentagem da película de milho removido durante o seu processamento, mais branca se torna a sua farinha. e tem influência direta no preço do mercado da farinha. Assim, quanto mais branca for a farinha, maior é o preço de venda. O branqueamento da farinha é um critério de qualidade deste derivado e isto, pode estar relacionado com os teores baixos de aflatoxinas encontrados nesta pesquisa.

No estudo realizado em Quênia por Nabwire *et al.* (2019), os autores compararam os níveis de contaminação de aflatoxinas em amostras de farinha de milho e grão de milho coletada ambas na região de Siaya, os autores constataram que houve mais contaminação por AFB₁ em amostras de grão de milho 66,6% (n=43), 82,0±51,9 (µg.kg⁻¹) comparadas com a farinha de milho 41,4% (n = 53), 47,4 ±5,4 (µg.kg⁻¹).

Em outras pesquisas realizadas em outras regiões da África, consideram o milho e produtos à base de milho como sendo alimentos altamente susceptíveis a contaminação por aflatoxinas (KILONZO *et al.*, 2015; NABWIRE *et al.*, 2019). Neste presente estudo, apesar de haver maior detecção das aflatoxinas totais em algumas amostras, a contaminação não atingiu o limite máximo tolerável de 10,0 µg.kg⁻¹. Porém, é importante que se realize avaliações de exposição às aflatoxinas através do consumo da farinha de milho, uma vez que se trata de alimento de primeira necessidade e que constitui 80% da dieta das populações residentes em zona rurais de Moçambique.

3.4 Avaliação de risco

Os resultados de contaminação apresentados no presente estudo demonstraram que as concentrações medianas da AFB₁, foram inferiores ao LQ. Por este motivo, a avaliação de risco foi realizada apenas para AFT. Os valores da MOE foram utilizados para estimar o risco carcinogênico em dois cenários: C1 para homens e C2 para as mulheres decorrentes da exposição às aflatoxinas pelo consumo da farinha de milho. De acordo com a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), um valor para a MOE igual ou superior a 10.000 indica uma situação de risco negligenciável ou de pouca preocupação com relação à saúde pública e o inverso representa uma preocupação (EFSA, 2020).

Os parâmetros utilizados para o cálculo da ingestão referentes à AFT para o consumo de farinha de milho, por homens e mulheres estão descritos na tabela 6 e da MOE representado na figura 4. Os valores da MOE foram muitas vezes inferiores a 10.000, caracterizando um alto risco em relação aos efeitos carcinogênicos das aflatoxinas na população de Moçambique pelo consumo de farinha de milho. No entanto, a estimativa de ingestão diária de aflatoxinas devido ao consumo de farinha de milho demonstra que os homens (ED média = 0,001695 µg.kg⁻¹ pc/dia) apresentam menor risco carcinogênico decorrente da exposição às aflatoxinas totais que as mulheres (ED média = 0,001785 µg.kg⁻¹ pc/dia). Isto se deve a diferença de peso corporal entre os dois sexos, o homem pesa 1,1 vezes mais que a mulher.

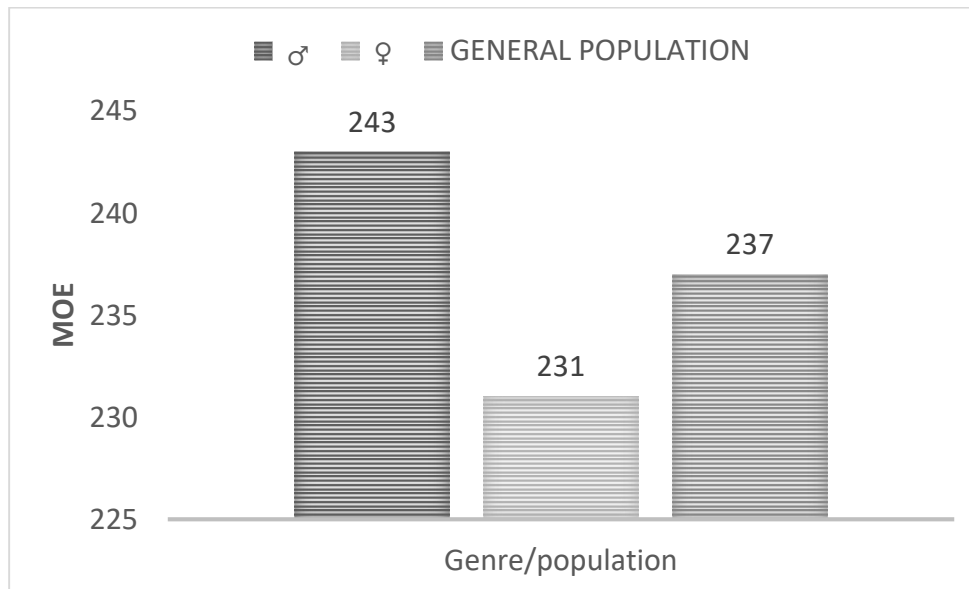
Tabela 6 – Descrição dos dados da ingestão de aflatoxinas totais diárias para o consumo de farinha de milho em Moçambique por sexo.

	AFT $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Ingestão diária de farinha (kg)	PC (kg) Homens	PC (kg) Mulheres	ED ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ PC) Homens	ED ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ 1PC) Mulheres
Média	0,89	0,116	59,2	56,2	0,00165	0,00173

AFT = (AFB₁+ AFB₂+ AFG₁+ AFG₂);

ED = Estimativa de Ingestão;

Figura 4 – Descrição das MOEs para aflatoxinas totais devido ao consumo da farinha de milho para homens, mulheres e população adulta geral de Moçambique.



As margens de exposição para as aflatoxinas devido ao consumo médio de farinha de milho estão demonstrados na Figura 4, onde os valores das MOEs foram 243, 231 e 237 para homens, mulheres e população geral adulta de Moçambique, respectivamente. A MOE para população geral foi determinada com base na estimativa de ingestão diária média e também o peso médio dos indivíduos adultos anteriormente apresentados. Os valores das MOEs foram muitas vezes inferiores a 10.000, valor de corte para risco negligenciável, cerca de 41x para os homens e 43x para mulheres. Assim, o resultado da MOE sugere que a população de Moçambique possui um risco elevadíssimo de efeito carcinogénico devido à exposição às aflatoxinas, o qual está associado ao alto consumo da farinha de milho, onde conforme dados disponíveis na literatura, o consumo médio da farinha de milho na população adulta de

Moçambique foi estimado em 116 g/per capita/dia. Apesar dos teores detectados serem baixos, ou seja, abaixo do LMT ($10 \mu\text{k.kg}^{-1}$) em Moçambique, assim como quando comparado com o padrão da União Europeia ($4 \mu\text{k.kg}^{-1}$) (FAO 2003; UE 2021). A determinação da MOE muitas vezes inferior a 10.000 pode ser consequência do consumo diário da farinha de milho pela população moçambicana que é muito elevado, dado ser uma dieta com muita pouca diversidade.

Estudos realizados na África relataram que consumo diário elevado de alimentos contaminados com aflatoxinas, mesmo em concentrações abaixo dos limites aceitáveis, não garante a segurança alimentar e aumentam consideravelmente a exposição a esses contaminantes, promovendo assim a situações de risco problemáticas (TFNC, 1997; SHEPHARD, 2008).

Estudos realizados em Gana, e outro na Gambia avaliaram a exposição às aflatoxinas associado ao consumo de um alimento à base de milho fermentado, e sorgo respectivamente, para os autores, o consumo excessivo (1000 g/dia) de um único alimento contaminado leva a exposições extremamente altas a micotoxinas. No estudo realizado na Gambia teve obtido estimativa de exposição de 1,4 ng/kg de peso corporal/dia e a MOE de 621,4 representando assim risco carcinogénico elevadíssimo devido ao consumo de sorgo pela população gambiense (JESPERSEN *et al.*, 1994; SHEPHARD, 2008). Outros estudos concluem que a exposição às micotoxinas é um problema de saúde pública e medidas de prevenção devem ser adotadas (OKARU *et al.*, 2021; ADEYEYE; IDOWU-ADEBAYO, 2021; ROCHA *et al.*, 2023).

4. Conclusões

Os resultados sugerem que apesar de terem sido detectadas concentrações baixas de aflatoxinas nas amostras analisadas, o consumo da farinha de milho em Moçambique representa um risco carcinogénico elevadíssimo da exposição às aflatoxinas. Assim é fundamental o desenvolvimento de mais estudos relacionados com o tema, bem como, na prevenção e no controle de possíveis contaminações de AFs ao longo da cadeia alimentar. Além disso, é necessário proceder à constante implementação de boas práticas agrícolas e de fabrico, bem como, melhores condições de secagem, transporte, armazenamento e controle rigoroso dos locais de armazenamento dos gêneros alimentícios.

É extremamente importante que se realize análise objetiva dos pontos críticos em todas as etapas da cadeia alimentar, ou seja, desde o campo até a mesa, com o objetivo de minimizar a exposição humana às AFs. Além do mais, Moçambique não possui uma legislação que estabelece limites máximos de tais contaminantes permitidos na farinha de milho, o limite máximo permitido utilizado no presente estudo é referente ao estabelecido para grão de milho

e amendoim. Assim espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam contribuir para a base no desenvolvimento de outras pesquisas, e conscientização das autoridades moçambicanas durante o processo de formulação dos limites máximos tolerados para aflatoxinas totais em particular AFB₁ na farinha de milho e em outros alimentos considerados de necessidade básica em Moçambique e nos demais países da África.

Perpectivas para os agricultores:

- ✓ Extremamente importante a implementação cuidadosa das boas práticas agrícolas em toda cadeia produtiva não só do milho, mas também de todos alimentos agrícolas;
- ✓ Aos produtores da farinha de milho, garantir boas condições transporte dos grãos, de armazenamento e do fabrico da farinha de milho;
- ✓ Aprovação pelas autoridades moçambicanas de uma legislação que obrigue as fábricas processadoras principalmente de alimentos para implementação do Sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP), de modo a garantir melhor qualidade dos alimentos disponibilizados no mercado;
- ✓ Necessário o desenvolvimento de estudos para avaliar a estimativa média de ingestão diária do milho e seus derivados *per capita* na população adulta e infantil de Moçambique;
- ✓ Para comunidade académica e demais pesquisadores, é necessário o desenvolvimento de mais estudos desta natureza com o mesmo tipo de técnica analítica de modo que se possa produzir mais evidências científicas irrefutáveis que possam ser utilizadas pelas autoridades para o manejo e controle das aflatoxinas em cereais, mas também que possam servir de base para as autoridades de saúde nas suas atividades de intervenção comunitária.

Limitações do estudo:

- ✓ Falta de dados na literatura referente a ingestão diária média em grama per capita de milho e seus derivados para população infantil de Moçambique, impossibilitou a avaliação de risco carcinogénico nesta população que é considerada bastante vulnerável uma vez que a ingestão desses alimentos neste público inicia geralmente entre os 4 a 5 meses de idade;
- ✓ Falta de padrões de micotoxinas para detecção de outras micotoxinas possíveis de serem encontradas no milho.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. (In) segurança alimentar e terotório em Moçambique: discursos políticos e práticas. **Revista Nera**, v. 38, n. 1, p. 106-131, 2017.
- ADEYEYE, S. A. O.; ASHAOLU, T. J.; IDOWU-ADEBAYO, F. Mycotoxins: Food Safety, Consumer Health and Africa's Food Security. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 42, n. 8, p. 5779–5795, 2021. DOI: [10.1080/10406638.2021.1957952](https://doi.org/10.1080/10406638.2021.1957952)
- ALMEIDA, R. L. J. *et al.* Análise de granulometria e umidade de Farinhas de milho flocada comercializadas na cidade de Campina Grande – PB. **Revista Brasileira de Agrotecnologi**, v. 7, n. 2, p. 185 – 189, 2017.
- ARROYO-MANZANARES, N. *et al.* Aflatoxins in animal feeds: A straightforward and cost-effective analytical method. **Food Control**, v. 54, n.1, p. 74–78, 2015. DOI: [10.1016/j.foodcont.2015.01.027](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.027)
- AUGUSTO, J. *et al.* Prevalence and Distribution of Aspergillus section Favi in maize and groundnut fields and Aflatoxin contamination in Mozambique. **The American Phytopathological Society: Minneapolis**, v. 1, n.1, p. 9–13, 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.2011
- BRASIL. Instrução Normativa – IN Nº 263, de 23 de Setembro de 2005. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0263_22_09_2005.html> acesso em: 01 de Outubro de 2022
- BRASIL. Instrução Normativa – IN Nº 88, de Março de 202. Disponível em: <http://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/instrucao-normativa-2021_88-anvisa.pdf> acesso em: 22 de Agosto de 2022
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. 2017.
- CASADEI, E. Os contaminantes nos alimentos. In Mocambique: Águas, Alimentos e Ambiente; Molisv: Rome, Italy, 1980.
- CAMBAZA, E.; KOSEKI, S.; KAWAMURA, S. Aflatoxins in Mozambique: Etiology, epidemiology and control. **In Agriculture**, v. 8, n. 7, 2018. DOI: [10.3390/agriculture8070087](https://doi.org/10.3390/agriculture8070087)
- CASTRO, I. M. de; DOS ANJOS, M. R.; TEIXEIRA, A. da S. Análise de Aflatoxinas B1, G1, B2 e G2 em Castanha-do-Brasil, Milho e Amendoim Utilizando Derivatização Pós-Coluna no Sistema Cromatográfico CLAE/ Kobra Cell®/DFL. **Comunicado Técnico**, ISSN 0103 5231, 2013.
- DOMENICO, A. S. D. *et al.* Análise de trilha da contaminação por aflatoxinas em grãos de milho armazenados. **Pesq. Agropec. Bras. Brasília**, v. 50, n. 6, p. 441-449, 2015. DOI: 10.1590/S0100-204X2015000600002

EFSA, European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of aflatoxins in food. **The EFSA Journal**, 2019.

EFSA, European Food Safety Authority. Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. **EFSA Journal**, v. 8, n. 3, p.1557, 2010.

EL-KASSAS, M.; ELBADRY, M. Hepatocelular Carcinoma in Africa: Challenges and Opportunities. **Frontiers in Medicine**, v. 9, n. 899420, p.1-4, 2022. DOI:10.3389/fmed.2022.899420

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Manual sobre la aplicación del sistema de Análises de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. **Estudio FAO alimentación Nutrición**, v. 73, n., p. 1-130, 2003.

Health. Mo, Statistics. Nio, & International. I. Mozambique. in Demographic and Health Surveys (MISAU, INE, ICFI). Calverton, Maryland, USA, p. 430, 2019.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, & International Agency for Research on Cancer: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene (No. 82). World Health Organization, 2002.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos-DOC-CGCRE-008, revisão 05-ago-2016. Disponível at: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4. ed. São Paulo: IMESP. P.98-99. Disponível em http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf

IPCS. International Programme on Chemical Safety. Environmental health criteria 240 – principles and methods for the risk assessment on chemicals in food. Retrieved June 12, 2023 Disponível em: <http://tinyurl.com/pscggxlx>.

JAIMEZ, J. *et al.* Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. In **Journal of Chromatography A**, v. 882, p.1-10, 2000. DOI: [10.1016/S0021-9673\(00\)00212-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00212-0)

JARDIM, A.N.O.; CALDAS, E.D. Exposição Humana a Substâncias Químicas Potencialmente Tóxicas na Dieta e os Riscos para Saúde. **Revista Quim. Nova**, v. 32, p. 1898-1909, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000700036

JESPERSEN, L.; HALM, M.; KPODO, K.; JAKOBSEN, M. Significance of yeasts and moulds occurring in maize dough fermentation for “kenkey” production. In **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p.239-248, 1994. DOI: 10.1016/0168-1605(94)90122-8

KILONZO, R. M.; IMUNGI, J. K.; MUIRU, W. M.; LAMUKA, P. O.; e NJAGE, P. M. K. Household dietary exposure to aflatoxins from maize and maize products in Kenya. **Food Additives and Contaminants - Part A**, v. 31, n.12, p. 2055–2062, 2014. DOI:10.1080/19440049.2014.976595

LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. Guelph: University Books. 1995.

MACIEL, L.F. *et al.* Aflatoxins and Ochratoxin A in different Cocoa clones (*Theobroma cacao* L.) developed in the southern region of Bahia, Brazil. **Food Additives and Contaminants - Part A**, v. 35, p.134–143, 2017. DOI: [10.1080/19440049.2017.1397293](https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1397293)

MALLMANN, C.A.; TYSKA, D.; ALMEIDA, C.A.A.; OLIVEIRA, M.S., e GRESSLER, L.T. Mycotoxicological monitoring of breakfast and infant cereals marketed in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 331, 2020.. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108628>

Maputo, Moçambique, Instituto Nacional de Estatística: 13 e 15. Disponível em: <http://www.ine.gov.mz/pt/ResourceCenter>. Acesso em: 22 Marc. 2022.

Ministerio da Saude (MISAU); Instituto Nacional de Estatística (INE) e ICF International (ICFI). Moçambique Inquérito Demográfico e de Saúde 2011. Calverton, Maryland, USA: MISAU, INE e ICFI, Maputo, v. 3, p. 153-173, 2013.

NABWIRE, W. R.; OMBAKA, J.; DICK, C. P.; STRICKLAND, C.; TANG, L.; XUE, K. S.; e WANG, J. S. Aflatoxin in household maize for human consumption in Kenya, East Africa. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, v.13, n.1, p.45–51, (2020). DOI: 10.1080/19393210.2019.1690053

NCD RISK FACTOR. Altura média do homem e da mulher. Dados mundiais, 2023. Disponível em: <<https://www.dadosmundiais.com/altura-media.php>>. Acesso em: 17, Janeiro 2023

INNOQ. Norma Moçambicana. (2017). Cereais – Especificações para a farinha de milho fortificadas incluindo método de análise e amostragem. CNT, 3ª Edição, Maputo.

OKARU, A. O.; LACHENMEIER, D. W. Margin of exposure analyses and overall toxic effects of alcohol with special consideration of carcinogenicity. **In Nutrients**, v. 13, n. 11, 2021. DOI: 10.3390/nu13113785

RAHAYU, W.P. *et al.* Risk Estimation of Hepatocellular Carcinoma due to Exposure to Aflatoxins in Maize from Yogyakarta, Indonesia. **Journal of Food Quality and Hazards Control**, v. 7, n. 1, p. 45-50, 2020. DOI: 10.18502/jfqhc.7.1.2451

RANUM, P.; PEÑA-ROSAS, J. P.; GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1312, n.1, p. 105–112, 2014. DOI: [10.1111/nyas.12396](https://doi.org/10.1111/nyas.12396)

ROCHA, A. R. *et al.* Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in beers produced in Brazil and their carcinogenic risk Assessment. **Food Control**, v. 145, n., 2023. DOI: [10.1016/j.foodcont.2022.109348](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109348)

SCHRENK, D. *et al.* Risk assessment of aflatoxins in food. **EFSA Journal**, v. 18, n .3, p.102-108, 2020. DOI: [10.2903/j.efsa.2020.6040](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040)

SCUDAMORE, K. A.; PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food Additives and Contaminants*, v. 17, n. 5, p. 407-416, 2000.

SHEPHARD, G. S. Risk assessment of aflatoxins in food in Africa. **Food Additives and Contaminants - Part A**, v. 25, n. 10, p. 1246–1256, 2008. DOI: 10.1080/02652030802036222

UE, European Commission. Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão, de 23 de fevereiro de 2006, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. OJ L. 70.12–34, 2006.

UE. Legislação da União Europeia: Regulamento (UE) 2021/1399 da Comissão de Agosto de 2021. Disponível em: <<https://www.lamic.ufsm.br/site/legislacoes/legislacao-da-uniao-europeia>>. Acesso em: 13 mar, 2023.

VAN RENSBURG, S. J. *et al.* Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. **In Br. J. Cancer**, v. 51, n., 1985.

VICAM.. AflatestWB Instruction Manual. Retrieved from <http://www.weber.hu/Downloads/VicamManuals/G1068.pdf>. 2008. Accessed April 8, 2020.

VILLERS, P. Aflatoxins and safe storage. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p.1-6, 2014. DOI: [10.3389/fmicb.2014.00158](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00158)

WACOO, A. P. D.; VUZI, P. C.; HAWUMBA, J. F. Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. **Journal of Applied Chemistry**, 2014. DOI: [10.1155/2014/706291](https://doi.org/10.1155/2014/706291)

WARTH, B. *et al.* Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n., p. 9352–9363, 2012. DOI: [10.1021/jf302003n](https://doi.org/10.1021/jf302003n)

WILLIAMS, J. H. *et al.* HIV and hepatocellular and esophageal carcinomas related to consumption of mycotoxin-prone foods in sub-Saharan Africa. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 92, n., p.154–160, 2010. DOI: [10.3945/ajcn.2009.28761](https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28761)

ZHANG, K. *et al.* Mycotoxins in infant/toddler foods and breakfast cereals in the US retail market. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, v. 11, n. 3, p. 183–190, 2018. DOI: [10.1080/19393210.2018.1451397](https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1451397)

Anexo I



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE
CONSELHO EXECUTIVO PROVINCIAL DE NAMPULA
DIRECÇÃO PROVINCIAL DA INDÚSTRIA E COMÉRCIO
GABINETE DO DIRECTOR

CREDENCIAL

Estão devidamente credenciados os Técnicos desta Direcção Provincial da Indústria e Comércio afectos no Departamento da Indústria, a fim de acompanhar na realização de um trabalho de colecta de dados sobre ocorrência de aflatoxinas na farinha de milho, do docente da UniLurio de nome **Martinho Gamas Dinis Martinho** pertencente a Faculdade de Ciências de Saúde, nos estabelecimentos Industriais, situadas na Cidade de Nampula onde V.Excia é digno proprietário e /ou representante legal:

1. **Paulo António Piereque Vevelua;**
2. **Ossufo Assane**

Para que não haja qualquer impedimento na concretização da actividade, passou-se a presente Credencial, que vai por mim assinada e autenticada com o carimbo a tinta de óleo em uso nesta Instituição.

Outrossim, pedimos o apoio necessário para o efeito.

Nampula, 06 de Dezembro de 2021

O Director Provincial

 Alfredo da Piedade João Nampulo
/Inspector Superior das Actividades Económicas/

Direcção Provincial da Indústria e Comércio, Avenida 25 de Setembro nº351, telefex - 26213953. info@dpnampula@gmail.com,
 Nampula