

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**MICOTOXINAS EM ALIMENTOS E BEBIDAS NACIONAIS
PRODUZIDOS E COMERCIALIZADOS EM DIFERENTES
REGIÕES DO BRASIL**

LUCIANE MIE KAWASHIMA

Engenheira de Alimentos

Mestre em Engenharia de Alimentos na área de Ciência de Alimentos

Profa. Dra. LUCIA MARIA VALENTE SOARES

Orientadora

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de Doutor em Ciência de
Alimentos**

CAMPINAS – SP

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

K179m Kawashima, Luciane Mie
Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais
produzidos e comercializados em diferentes regiões do
Brasil / Luciane Mie Kawashima. – Campinas, SP: [s.n.],
2004.

Orientador: Lucia Maria Valente Soares
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Micotoxinas. 2.Fumonisinias. 3.Cerveja. 4.Milho.
5.Tomate. I.Soares, Lucia Maria Valente. II.Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III.Título.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. LUCIA MARIA VALENTE SOARES
(Orientadora)

Dra. MYRNA SABINO

Profa. Dra. SILVANA DA MOTTA

Prof. Dr. EDUARDO MICOTTI DA GLÓRIA

Dr. EDUARDO VICENTE

Profa. Dra. ADRIANA Z. MERCADANTE

Prof. Dr. MIGUEL MACHINSKI JUNIOR

Campinas, 13 de fevereiro de 2004.

**Aos meus pais, Shigenori e Luiza, pelo início
E ao Gus, pela compreensão, carinho e incentivo.
Com amor,
Dedico.**

**“Algo só é impossível até que alguém duvida
e acaba provando o contrário.” (Albert Einstein)**

**“É preciso ser um realista
para descobrir a realidade.
É preciso ser um romântico
para criá-la.” (Fernando Pessoa)**

**“Só se vive uma vez!”
(Gustavo Oliveira)**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lúcia M. Valente Soares pela orientação e paciência, por me amparar nos momentos de dúvidas e incertezas e acima de tudo por acreditar na minha capacidade, minha sempre eterna admiração.

Aos membros da banca examinadora pelas inestimáveis sugestões apresentadas e atenção dispensada.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Aos pesquisadores Roberto Moraes e Eduardo Vicente pela gentileza na concessão de uso da balança e do moinho no Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Análise de Alimentos e da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP pelo carinho e apoio.

Às minhas “famílias” pela compreensão e amor irrestritos mesmo nas horas de minha ausência.

À minha querida sobrinha, Jéssica Mari, pelos momentos de alegria e descontração.

À Natália, Adriana e Regina pela amizade e cumplicidade sempre.

E a todos que colaboraram para tornar este trabalho uma realidade.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras	x
Resumo Geral	xi
General Summary	xiv
Introdução Geral	1
Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica	3
1. Principais Micotoxinas e Micotoxinas Potencialmente Importantes em Alimentos	4
1.1. Introdução	4
1.2. Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	5
1.3. Ocratoxina A	7
1.4. Zearalenona	9
1.5. Fumonisinias	10
1.6. Patulina	13
1.7. Verruculogeno	14
2. Co-ocorrência de Micotoxinas	15
3. Importância de Alguns Tipos de Alimentos e Bebidas no Brasil	17
3.1. Polpa de tomate	17
3.2. Milho	19
3.3. Cerveja	21
4. Determinação de Micotoxinas em Alimentos	21
4.1. Extração	23
4.2. Limpeza	24
4.3. Detecção e Quantificação	26
Referências Bibliográficas	30
Capítulo 2 - The Development of an Analytical Method For Two Mycotoxins, Patulin and Verruculogen, and Survey of their Presence in Commercial Tomato Pulp	51
Abstract	52

Introduction	52
Materials and Methods	53
Results and Discussion	54
Resumo	55
References	56
Capítulo 3 - Avaliação da Incidência de Fumonisina B ₁ , Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ , Ocratoxina A e Zearalenona em Produtos de Milho Comercializados em Recife, Estado de Pernambuco	57
Resumo	58
Introdução	59
Material e Métodos	62
Resultados e Discussão	66
Conclusões	73
Referências Bibliográficas	73
Capítulo 4 - Avaliação da Incidência de Fumonisina B ₁ em Cervejas Brasileiras	80
Resumo	81
Introdução	82
Material e Métodos	83
Resultados e Discussão	85
Conclusão	91
Referências Bibliográficas	91
Conclusões Gerais	95

LISTA DE TABELAS

Área cultivada e produção brasileira de tomate industrial, 1990-2002	18
Teores de vitaminas em tomate maduro	19
Produção mundial de milho	20
Estimativa de consumo de milho em grãos no Brasil	20
Consumo per capita de cerveja no período 1999-2000	21
Micotoxinas - Características físico-químicas	22
Recovery of patulin and verruculogen added to tomato pulp at five different levels	54
Recoveries for patulin and verruculogen added to tomato pulp samples at the single level of 100 ng/g	54
Recuperação de fumonisina B ₁ em produtos de milho contaminados artificialmente com 250 µg/Kg de fumonisina B ₁ com cartuchos SAX em primeiro uso	67
Recuperação de fumonisina B ₁ em produtos de milho contaminados artificialmente com 250 µg/Kg de fumonisina B ₁ com cartuchos SAX em segundo uso	67
Ocorrência de micotoxinas em amostras de produtos de milho comercializados de 1999 a 2001 em Recife, Estado de Pernambuco	70
Recuperação de fumonisina B ₁ adicionada a várias concentrações em amostras de cerveja	86
Ocorrência de fumonisina B ₁ nas amostras de cerveja analisadas	89

LISTA DE FIGURAS

Estruturas químicas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	6
Estrutura química da ocratoxina A	8
Estrutura química da zearalenona	10
Estruturas químicas das principais fumonisinas	11
Estrutura química da patulina	13
Estrutura química da verruculogeno	14
Chromatograms of tomato pulp samples spiked with 100 ng/g patulin and 100 ng/g of verruculogen	55
Patulin and verruculogen spectra taken during chromatographic run of standards	55
Cromatograma de padrão de fumonisina B ₁ (concentração= 2,7µg/mL) após derivação com reagente o-ftaldialdeído/2-mercaptoetanol	68
Cromatograma de uma amostra de fubá não contaminada com fumonisina B ₁	68
Cromatograma de uma amostra de flocos de milho pré-cozido contaminada com fumonisina B ₁ (concentração = 200 µg/Kg)	69
Cromatograma de padrão de fumonisina B ₁ (concentração = 4 ng/mL)	87
Cromatograma de uma amostra de cerveja não contaminada com fumonisina B ₁	87
Cromatograma de uma amostra de cerveja contaminada com fumonisina B ₁ (concentração = 14,3 ng/mL)	88

RESUMO GERAL

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos que apresentam efeitos tóxicos em seres humanos e animais. São de grande importância para a saúde pública e a economia de um país. No Brasil, as micotoxinas têm sido objeto de pesquisa principalmente no centro-sul e recentemente na região sul do país. Nas demais regiões há uma grande lacuna de informações sobre a contaminação de alimentos por estas toxinas. Por outro lado, há um grande número de alimentos nacionais que ainda não foram analisados para micotoxinas, assim como várias toxinas que não foram pesquisadas no país.

Com o objetivo de avaliar a contaminação de alimentos e bebidas produzidos em várias regiões do Brasil por micotoxinas, o presente trabalho foi realizado em três etapas: (a) Desenvolvimento de um método analítico para a determinação de patulina e verruculogeno por cromatografia líquida de alta eficiência em polpa de tomate e avaliação da presença destas micotoxinas em polpa de tomate processada em duas regiões do Brasil; (b) Avaliação da ocorrência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho comercializados em uma cidade do nordeste do país; (c) Pesquisa da ocorrência de fumonisina B₁ em cervejas produzidas em vários Estados brasileiros.

Na primeira parte, foi desenvolvido e avaliado intralaboratorialmente um método para determinação de patulina e verruculogeno em polpas de tomate. O método desenvolvido compreende extração com acetato de etila, limpeza em coluna de sílica gel e determinação e confirmação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos na faixa do ultravioleta. Os limites de quantificação foram de 10 ng/g para patulina e 20 ng/g para verruculogeno. Foi estudada a ocorrência das toxinas em polpas de tomate embaladas assepticamente em 14 lotes da safra 1996/1997 e 15 lotes da safra 1997/1998 produzidos por uma indústria localizada no Estado de São Paulo e por outra localizada no Estado de Goiás. Patulina e verruculogeno não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas.

Em outra etapa, foi avaliada a presença de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em 74 amostras de produtos a base de milho adquiridas no comércio da cidade de Recife, PE, durante o período de 1999 a 2001. Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona foram determinadas segundo o método de SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) por cromatografia em camada delgada. A determinação de fumonisina B₁ foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência de acordo com o método de SHEPHARD et al. (1990) com modificações segundo CAMARGOS et al. (1999). De todas as micotoxinas analisadas, a fumonisina B₁ foi a mais freqüentemente encontrada, estando presente em 94,6% das amostras em concentrações variando de 20 a 8600 µg/Kg. Apenas 5 amostras apresentaram resultados positivos para aflatoxina B₁ (máximo = 20 µg/Kg) e 3 amostras continham aflatoxina B₂ (máximo = 3 µg/Kg). Duas das amostras ultrapassaram o limite de 20 µg/Kg para a somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, uma amostra de farinha de milho pré-cozida (21,5 µg/Kg) e uma de quirera (23,3 µg/Kg). Aflatoxinas G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas. Todas as amostras contaminadas com aflatoxinas também apresentaram fumonisina B₁, mas não foi encontrado nenhum padrão que explicasse a co-ocorrência entre as micotoxinas.

Finalmente, 58 cervejas nacionais adquiridas no período de 2000 a 2001 e provenientes de nove Estados brasileiros: São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Sergipe (SE), Pará (PA), Pernambuco (PE), Paraíba (PB), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ) e Rio Grande do Sul (RS) foram analisadas para fumonisina B₁ usando extração, limpeza e concentração com colunas de extração em fase sólida por troca iônica forte, seguida por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência após reação de derivação com o-ftaldialdeído. O limite de quantificação foi de 1 ng/mL. Das 58 amostras analisadas, 25 amostras (43,1%) continham fumonisina B₁. O conteúdo de FB₁ das amostras positivas variou de 1 a 40 ng/mL, com uma concentração média de 9,6 ± 10,2 ng/mL. Apesar da baixa contaminação verificada, a adoção de um sistema de controle da matéria-prima nas cervejarias seria interessante, já que a contaminação de cereais por

micotoxinas pode variar de ano para ano e garantiria um produto de melhor qualidade para o consumidor.

GENERAL SUMMARY

Mycotoxins are secondary fungi metabolites with toxic effects for humans and animals. They are of great importance for the public health and the economy of a country. In Brazil, mycotoxins have been the object of research mainly in the center south region and more recently in the southern region of the country. There is a lack of information about foods consumed in other regions. On other hand, there are a great number of Brazilian foods unexamined for the presence of mycotoxins as well as mycotoxins that have not been studied in the country.

With the objective of examining foods and beverages produced in different regions of the country, the present work was divided in three main bodies: (a) Development of an analytical method for determining patulin and verruculogen by high performance liquid chromatography in tomato pulps followed by a survey of the presence of these toxins in tomato pulps processed in two Brazilian regions; (b) Evaluation of the occurrence of fumonisin B₁, aflatoxins B₁, B₂, G₁ e G₂, ochratoxin A and zearalenone in corn-based food products commercialized in a northeastern city of the country; (c) Survey of the occurrence of fumonisin B₁ in beer produced in several Brazilian states.

During the first phase of the work, a method for the determination of patulin and verruculogen in tomato pulps was developed and evaluated. The method involved an extraction with ethyl acetate, cleanup with a silica gel column and quantification by high performance liquid chromatography with diode array detector. Quantification limits were 10 ng/g for patulin and 20 ng/g for verruculogen. Fourteen production lots of tomato pulps processed in 1996/1997 and 15 production lots processed in 1997/1998 from a plant located in the state of São Paulo and another located in the state of Goiás were analyzed for patulin and verruculogen. Patulin and verruculogen were found in none the samples analyzed.

In a second phase 74 samples of corn-based foods commercialized in the city of Recife, state of Pernambuco, during the period of 1999 to 2001, were analyzed for fumonisin B₁, aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, ochratoxin A and zearalenone. Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, ochratoxin A and zearalenone were

determined by thin layer chromatography according to SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989). Fumonisin B₁ was determined by high performance liquid chromatography as described by SHEPHARD et al. (1990) and modified by CAMARGOS et al. (1999). Among all mycotoxins searched for, fumonisin B₁ was the one most frequently found and it was present in 94.6% of the samples in concentrations varying from 20 to 8600 µg/Kg. Only 5 samples contained aflatoxin B₁ (max = 20 µg/Kg) and 3 of the samples also had aflatoxin B₂ (max = 3 µg/Kg). Two of the samples exceeded the limit of 20 µg/Kg for the sum of the aflatoxins B₁, B₂, G₁ e G₂, one sample of pre-cooked corn flour (21.5 µg/Kg) and one sample of corn grits (23.3 µg/Kg). Aflatoxins G₁ e G₂, ochratoxin A and zearalenone were not detected in any of the samples analyzed. All samples contaminated with aflatoxins also contained fumonisin B₁, but no pattern of contamination could be found in the co-occurrence of these mycotoxins.

Finally, 58 Brazilian beers produced in 9 states (São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Sergipe (SE), Pará (PA), Pernambuco (PE), Paraíba (PB), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), and Rio Grande do Sul (RS)) and acquired during 2000 and 2001, were analyzed for fumonisin B₁ utilizing extraction, cleanup and concentration on a solid phase extraction cartridge with strong ion exchange characteristics, followed by derivatization with o-phthalaldehyde and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Quantitation limit was 1 ng/mL. Twenty-five samples (43.1%) of the total of 58 analyzed contained fumonisin B₁. The concentration of fumonisin B₁ in the samples varied from 1 to 40 ng/mL, with an average of 9.6 ± 10.2 ng/mL. The contamination found was low but it indicates the need of controlling raw materials used in breweries since mycotoxin contamination varies from year to year and such a procedure would guarantee a better quality product to the consumer.

INTRODUÇÃO GERAL

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos que são tóxicos para seres humanos e animais. Estas toxinas são de grande importância em termos econômicos e de saúde pública. Do ponto de vista econômico, causam prejuízos a produtores, processadores e comerciantes de alimentos e ao país como um todo, inclusive na redução de divisas quando os produtos exportados são recusados no exterior devido à presença de micotoxinas. Anualmente, de 25 a 50% da safra de frutas e vegetais são destruídos por fungos. O desenvolvimento de fungos em alimentos não implica necessariamente na presença de micotoxinas, mesmo tratando-se de um gênero potencialmente toxigênico. Porém há um risco implícito e que deve ser afastado. Do ponto de vista de saúde pública, a ONU estima que 40% da redução na expectativa de vida em países pobres, está relacionada com a existência de micotoxinas na dieta destas populações.

No Brasil, as micotoxinas têm sido pesquisadas principalmente no centro-sul do país. Recentemente, núcleos de pesquisadores têm surgido na região Sul, nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Como consequência da distribuição não homogênea dos grupos de pesquisa e das dimensões continentais do país, temos uma distribuição também não homogênea nos conhecimentos já adquiridos sobre a presença de micotoxinas em alimentos nacionais, ou seja, a situação dos alimentos produzidos e consumidos em algumas regiões do país continua uma grande incógnita.

Um outro aspecto a ser considerado é existência de uma série de alimentos nacionais que ainda não foram examinados com relação à contaminação por micotoxinas. Adicionalmente nota-se que dentre as micotoxinas conhecidas várias nunca foram pesquisadas no país.

O presente trabalho visa examinar um tipo de bebida e alguns alimentos produzidos ou comercializados em diferentes regiões brasileiras e que não foram estudados até o momento no país. Uma das micotoxinas abordadas no presente trabalho não foi pesquisada anteriormente no Brasil. O trabalho foi realizado em três etapas: (a) Desenvolvimento de um método analítico para a determinação de

patulina e verruculogeno por cromatografia líquida de alta eficiência em polpa de tomate e avaliação da presença destas micotoxinas em polpas de tomate processadas nos Estados de São Paulo e de Goiás; (b) Avaliação da ocorrência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho comercializados em Recife, Estado de Pernambuco; (c) Pesquisa da ocorrência de fumonisina B₁ em cervejas produzidas em diferentes Estados brasileiros.

Capítulo 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Principais Micotoxinas e Micotoxinas Potencialmente Importantes em Alimentos

1.1. Introdução

Os fungos podem causar efeitos indesejáveis para a agricultura e indústria de alimentos devido à sua versatilidade em se adaptar. Os fungos são ubíquos na natureza, podendo subsistir no solo, vegetação e água. Conseqüentemente é simples deduzir o seu potencial de contaminação (MOSS, 1992).

As micotoxinas são um grupo de metabólitos secundários produzidos por alguns fungos, os quais não são necessários para o crescimento e provavelmente possuem a função de limitar a competição. As toxinas destes fungos podem estar contidas nos esporos e micélios, ou serem excretadas como exotoxinas no substrato de crescimento (COLE & COX, 1981). A exposição humana as micotoxinas pelo consumo de alimentos é uma questão de saúde pública em todo o mundo (GOLDBLATT, 1977; SMITH et al., 1995; BRERA et al., 1998). A contaminação dos alimentos depende de crescimento fúngico e pode ocorrer no campo, durante e após a colheita, transporte, processamento e armazenamento do produto (SABINO, 1996).

O desenvolvimento de fungos não implica na presença de micotoxinas no substrato. Mesmo dentro de um gênero potencialmente toxigênico, nem todas as espécies produzem toxinas (CHELKOWSKI & LEW, 1992; BULLERMAN & TSAI, 1994; CASTRO et al., 1995). Também é importante esclarecer que a ausência de sinais aparentes de contaminação por fungos não significa que o alimento encontra-se livre de toxinas, já que elas podem permanecer no produto mesmo depois do desaparecimento dos fungos responsáveis por sua produção (SABINO, 1996).

Os surtos de micotoxicoses são normalmente sazonais, devido a condições climáticas particulares que favorecem o crescimento fúngico e/ou a produção de toxinas. A umidade e a temperatura são dois fatores críticos. Fatores geográficos, susceptibilidade da variedade e condições de armazenamento também interferem

na produção de micotoxinas, sendo que várias toxinas podem ser produzidas simultaneamente (BULLERMAN et al., 1984; VALENTE SOARES, 1987). As interações entre micotoxinas apresentam pelo menos um efeito tóxico aditivo senão sinérgico (CHAMBERLAIN et al., 1993; MILLER & WILSON, 1994).

Os sinais e sintomas das micotoxicoses vão desde lesões de pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade ou genitotoxicidade, podendo chegar à morte. As micotoxinas podem ainda apresentar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores (COLE & COX, 1981; JECFA, 1995, 1998, 2001)

A possível existência de micotoxinas nos alimentos tem sido objeto, desde sua descoberta, de uma intensa investigação com o intuito de detectá-las e prevenir sua ocorrência. No Brasil se verifica um aumento significativo na pesquisa de micotoxinas na última década. O número de artigos de pesquisa sobre micotoxinas (128 artigos) publicados por pesquisadores brasileiros entre 1991 a 2000 superou a soma de artigos (85 artigos) publicados nas três décadas anteriores (1961-1990), sendo que 30% das publicações foram sobre a ocorrência de micotoxinas em alimentos e rações (RODRIGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002).

Algumas micotoxinas são importantes em alimentos devido a sua alta frequência, como: aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona. Outras micotoxinas podem tornar-se alvo de estudo com a descoberta de novos dados experimentais ou epidemiológicos, como fumonisinas, patulina e verruculogeno.

1.2. Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

As aflatoxinas são um grupo de micotoxinas estruturalmente semelhantes, produzidas sobretudo por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Este grupo de micotoxinas é o que teve maior impacto no desenvolvimento de pesquisas na área de micotoxicologia, devido à sua implicação, na década de 60, na morte (doença X) de mais de 100.000 aves alimentadas com ração contaminada na Inglaterra (COLE & COX, 1981).

A aflatoxina B₁ é considerada atualmente como a mais tóxica e com maior poder carcinogênico dentre as micotoxinas (IARC, 1997), além de ser também a mais frequentemente encontrada em alimentos. A sua toxicidade aguda para o

fígado, hepatocarcinogênese, teratogênese, mutagênese, imunossupressão, efeito anticoagulante, anemia e diminuição da fertilidade são alguns dos efeitos nocivos da exposição as aflatoxinas. Os efeitos da intoxicação aguda por aflatoxinas caracterizam-se por danos hepáticos, tais como ascite, degeneração hepática, proliferação do ducto biliar e necrose hepática causados em várias espécies animais (BUTLER, 1974; CULLEN & NEWBERNE, 1994). Estima-se que cerca de 35% dos casos de câncer humano estejam diretamente relacionados à dieta, e a presença de aflatoxinas em alimentos é considerada um fator importante na produção de câncer hepático, principalmente em países tropicais (DOLL & PETO, 1981; CALDAS et al., 2002).

A estrutura química do grupo das aflatoxinas é caracterizada pela ligação de dihidrofurano ou tetrahidrofurano a uma estrutura cumarínica (Figura 1).

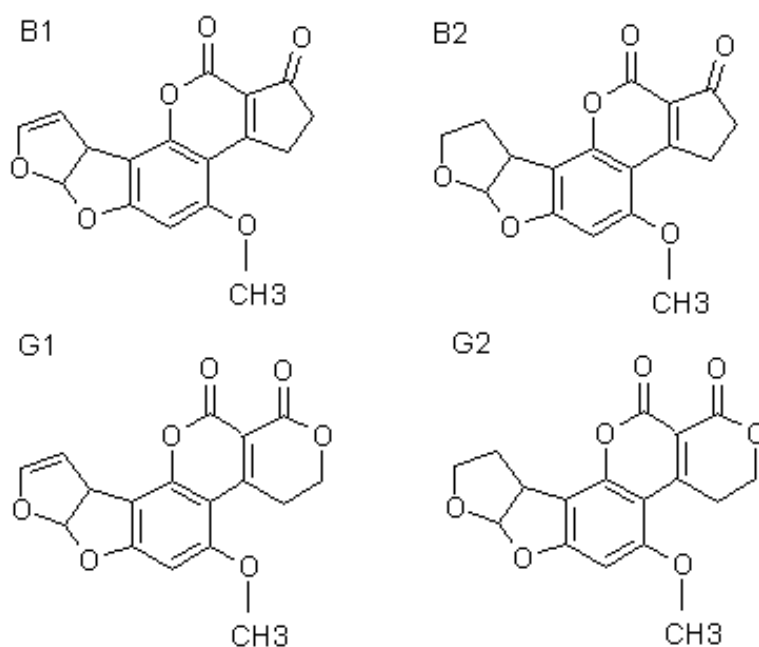


Figura 1. Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

A presença de aflatoxinas em alimentos tem sido reportada no mundo todo, principalmente em amendoim, nozes, milho, frutas secas, temperos, figo, cacau, arroz e algodão (JECFA, 1998). No Brasil, as aflatoxinas têm sido relatadas principalmente em amendoim (OLIVEIRA et al., 1991; COLAÇO et al., 1994;

ARAÚJO et al., 1994; MARTINS-MACIEL et al., 1996), mas vários trabalhos descrevem também contaminação de milho no Sudeste do Brasil (SABINO et al., 1989; VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; VALENTE SOARES & FURLANI, 1992; GLÓRIA et al., 1997). A contaminação de milho por aflatoxinas tem sido descrita principalmente para milho em grãos e com baixa frequência. Entretanto, alguns estudos indicam uma maior incidência, HENNIGEN & DICK (1995) relataram que 35% das amostras de milho analisadas apresentaram contaminação por aflatoxinas no Estado do Rio Grande do Sul. Contaminação por aflatoxinas foi encontrada em 60 das 110 amostras de milho recém-colhido analisadas (54,5%) por MACHINSKI JR et al. (2001) no Estado de São Paulo, com concentrações de aflatoxina B₁ variando de 6 a 1600 µg/Kg. CORRÊA et al. (2000) encontraram 56% das 600 amostras de milho provenientes do Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul, da Argentina e do Paraguai contaminadas com aflatoxinas. Em outro estudo, 98% das 264 amostras de milho em grão de vários Estados brasileiros estavam contaminadas por aflatoxinas (AMORIM et al., 2000). Alta frequência de contaminação (60% das amostras) também foi encontrada por CALDAS et al. (2002), apesar do número limitado de amostras analisadas (5 amostras).

1.3. Ocratoxina A

A ocratoxina A é o composto mais tóxico do grupo das 7 ocratoxinas existentes (BUSBY JR & WOGAN, 1981; OMS, 1983). É principalmente produzida pelo *Aspergillus alutaceus* (*Aspergillus ochraceus*) (KOZAKIEWICZ, 1989, citado por MARQUARDT & FROHLISH, 1992), embora também a produzam *Aspergillus melleus*, *Aspergillus sulphureus*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium commune*, *Penicillium purpurecens*, *Penicillium palitans*, *Penicillium verrucosum*, entre outros (MOSS, 1996). A ocratoxina A é predominantemente produzida pelo *Penicillium viridicatum* em climas frios e *Aspergillus alutaceus* em climas quentes (STEYN, 1984).

Quimicamente, as ocratoxinas são derivadas da dihidrometil-isocumarina ligada a L-β fenilalanina (Figura 2).

Ocratoxina A

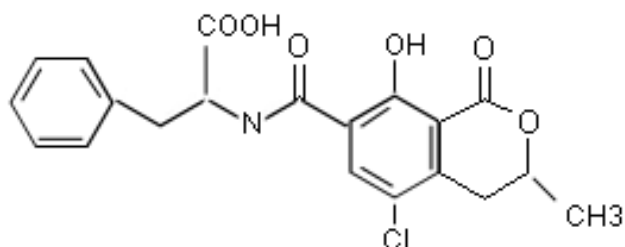


Figura 2. Estrutura química da ocratoxina A.

Todos os tipos de animais de laboratório testados mostraram sensibilidade a ocratoxina A. É nefrotóxica e pode causar câncer em animais de laboratório e suínos, possuindo também atividade teratogênica em ratos, camundongos e cricetos (“hamsters”) (BENFORD et al., 2001). A ocratoxina A está parcialmente relacionada com o aparecimento de câncer no trato urinário em áreas de exposição crônica na Europa oriental (CASTEGNARO et al., 1991). A chamada Nefropatia Endêmica dos Balcãs é uma disfunção renal que afeta a população da região da Bulgária, Romênia e Iugoslávia. É associada com a alta incidência e a concentração elevada de ocratoxina A nos alimentos consumidos nestas regiões (CASTEGNARO et al., 1987).

A ocratoxina A pode ser encontrada como contaminante principalmente nos cereais (cevada, arroz, milho, trigo, sorgo) e derivados, mas também tem sido relatada em café, uvas, cerveja, vinho, chocolate, carne, leite e derivados e especiarias (BENFORD et al., 2001). No Brasil, a ocratoxina A tem mostrado uma baixa frequência (RODRIGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002). A ocratoxina A foi encontrada em produtos de milho (1/130 amostras analisadas, na concentração de 32 µg/Kg), feijão (2/61 amostras analisadas, nas concentrações de 94 e 160 µg/Kg) e farinha de mandioca (2/45 amostras analisadas, nas concentrações de 32 e 65 µg/Kg) oferecidos ao consumo em Campinas, no Sudeste do país (VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Há também relatos de ocorrência em trigo e farinha de trigo no Rio Grande do Sul, FURLONG et al. (1999) analisaram 79 amostras de produtos a base de trigo e duas apresentaram-se contaminadas com 18 e 26 µg/Kg de ocratoxina A e VIEIRA et al. (1999)

encontraram 3 amostras de farinha de trigo contaminadas com ocratoxina A (concentração média de 12 µg/Kg) de um total de 54 amostras.

Vários trabalhos analisando café proveniente de várias regiões do Brasil encontraram ocratoxina A em até 70% das amostras analisadas, porém com concentrações médias inferiores a 5 µg/Kg (VALENTE SOARES et al., 2000; PRADO et al., 2000; LEONI et al., 2000). A ocratoxina A tem aparecido em até 50% das amostras de milho, trigo, arroz e feijão analisadas em vários Estados do Brasil (AMORIM et al., 2000; CORREA et al., 2000; VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). MACHINSKI JR et al. (2001) encontraram ocratoxina A em apenas 2 amostras de milho (206 e 128 µg/Kg) de 110 analisadas no Estado de São Paulo. Alguns levantamentos não detectaram a presença desta toxina em milho. Estes foram os casos de SABINO et al. (1986) e PRADO et al. (1995) que analisaram amostras de milho produzido em Minas Gerais, POZZI et al. (1995) que analisaram 130 amostras de São Paulo e GLÓRIA et al. (1997) que analisaram 292 amostras de milho provenientes de São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás.

1.4. Zearalenona

A zearalenona é descrita quimicamente como uma lactona do ácido fenólico resorcílico (Figura 3) e pode ser produzida por várias espécies de *Fusarium*, sendo que *Fusarium graminearum*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium culmorum* são os principais produtores. Estas espécies são conhecidas por colonizarem cereais e mostrarem tendência a se desenvolverem em baixas temperaturas (OMS, 1983).

A zearalenona é um composto estrogênico, reconhecidamente responsável pela síndrome estrogênica de suínos (MIROCHA & CHRISTENSEN, 1974; PRELUSKY et al., 1994). Embora a associação entre a exposição a zearalenona e o aparecimento de doenças em humanos ainda seja especulativa, puberdade precoce e ginecomastia em crianças observadas em Porto Rico foram correlacionadas com a alta concentração de zearalenona em alimentos à base de milho consumidos por esta população (KUIPER-GOODMAN et al., 1987).

Zearalenona

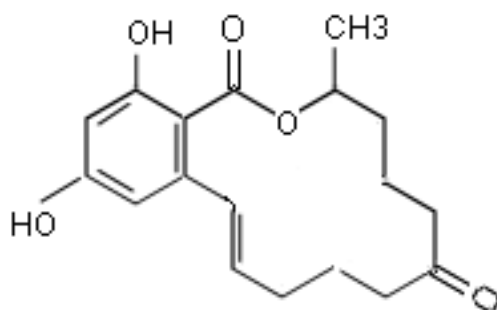


Figura 3. Estrutura química da zearalenona.

Praticamente todos os cereais e seus derivados podem ser contaminados por zearalenona, mas esta tem sido mais encontrada em trigo e milho. Zearalenona tem sido relatada em milho em vários países (DOKO et al., 1996; SCOTT, 1997; SCUDAMORE & PATEL, 2000). No Brasil, a zearalenona foi investigada em milho procedente das regiões Sul e Sudeste com resultados positivos em 5% das amostras (SABINO et al., 1989). O milho produzido em Minas Gerais foi também analisado para a zearalenona com um resultado positivo em 83 amostras (SABINO et al., 1986). O milho produzido no Estado de São Paulo foi analisado por MACHINSKI JR et al. (2001) e em 120 amostras apenas uma se apresentou contaminada (4640 µg/Kg). Em outro levantamento, VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) não detectaram a zearalenona em milho e produtos de milho, feijão, arroz e farinha de mandioca comercializados em Campinas, São Paulo. Outros trabalhos que também apresentaram resultados negativos para zearalenona em milho foram realizados com amostras do Rio Grande do Sul (FURLONG et al., 1999), Rio Grande do Sul e Mato Grosso (HENNIGEN & DICK, 1995) e São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (GLÓRIA et al., 1997).

1.5. Fumonisinias

As fumonisinias têm sido as micotoxinas mais pesquisadas nos últimos anos devido a sua recente descoberta, em 1988. Produzidas principalmente por *Fusarium moniliforme* e *Fusarium proliferatum* freqüentemente isolados de milho

(JECFA, 2001; WEIDENBOERNER, 2001). A distribuição dos fungos é similar, embora *Fusarium proliferatum* seja isolado mais freqüentemente de sorgo que de milho. Segundo BACON & NELSON (1994), um ou ambos os fungos podem ter uma freqüência de ocorrência de 90% ou mais em milho e 90% dos *Fusarium moniliforme* isolados produzem fumonisinas. Neste grupo de micotoxinas, as fumonisina B₁, B₂ e B₃ são as mais comuns (Figura 4). A fumonisina B₁ é considerada a mais importante devido a sua maior toxicidade e por geralmente representar até 70% do total de fumonisinas produzidas em culturas de laboratório ou em milho naturalmente contaminado (CAWOOD et al., 1991).

Foi demonstrado que a fumonisina B₁ é um hepatocarcinógeno não genotóxico para ratos, além de ter efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e imunossupressor nestes animais (GELDERBLOM et al., 1991). A fumonisina B₁ pode causar leucoencefalomalácia (LEME) em cavalos (KELLERMAN et al., 1990; ROSS et al., 1990; THIEL et al., 1991) e edema pulmonar em suínos (EPS) (HARRISON et al., 1990; COLVIN & HARRISON, 1992). Embora não exista evidência definitiva de carcinogenicidade em humanos, já foi reportado que há freqüência maior de câncer de esôfago em regiões onde o milho é a base da dieta e os níveis de contaminação por *Fusarium* e/ou fumonisinas são altos (THIEL et al., 1992; JECFA, 2001).

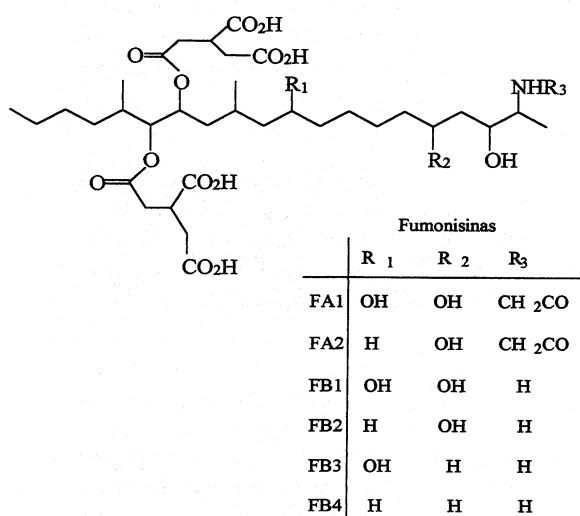


Figura 4. Estruturas químicas das principais fumonisinas.

A ocorrência natural de fumonisinas em milho e produtos derivados é a mais freqüente (WEIDENBOERNER, 2001). Estudos realizados em vários países demonstram que o milho geralmente apresenta-se contaminado com fumonisinas, sendo as concentrações variáveis (BULLERMAN, 1996; BULLERMAN & TSAI, 1994; DOKO & VISCONTI, 1994; SHEPHARD et al., 1996). Mesmo assim, as fumonisinas podem ser consideradas uma ameaça potencial à saúde humana e de outros animais (SYDENHAM et al., 1992a; PITTET et al., 1992; THIEL et al., 1992; SANCHIS et al., 1994).

As fumonisinas, principalmente a fumonisina B₁, têm sido detectadas em todos os tipos de produtos derivados de milho (SYDENHAM et al., 1991; BULLERMAN, 1996; BULLERMAN & TSAI, 1994; DOKO & VISCONTI, 1994; SHEPHARD et al., 1996; PATEL et al., 1997; HENNIGEN et al., 2000a; HENNIGEN et al., 2000b). No Brasil, como ocorre em outras partes do mundo, há uma alta contaminação de milho e produtos derivados com fumonisinas. Fumonisinas B₁ e B₂ foram encontradas em quase todas as amostras de milho provenientes do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás analisadas no período entre 1990 a 1991 (HIROOKA et al., 1996). Em outro estudo durante a safra 1995-96 em milho também proveniente do Paraná o resultado foi semelhante (ONO et al., 1999). As fumonisinas B₁ e B₂ também foram detectadas em aproximadamente 50% dos alimentos à base de milho comercializados na cidade de Campinas, São Paulo (MACHINSKI JR & VALENTE SOARES, 2000).

Estudos demonstraram que a fumonisina B₁ é estável ao calor (ALBERTS et al., 1990; JACKSON et al., 1996a; JACKSON et al., 1996b) e resistente à fermentação do milho para a produção de etanol (SCOTT et al., 1995; BENNETT & RICHARD, 1996). A hidrólise alcalina é um método que se mostrou significativamente eficiente na remoção de fumonisina de milho (SYDENHAM et al., 1995; DOMBRINK-KURTZMAN et al., 2000).

Espécies de *Fusarium moniliforme* já foram isolados de cevada e trigo (VISCONTI & DOKO, 1994), mas não há evidência de produção de toxinas nestes cereais. Porém, as fumonisinas podem ser introduzidas na cerveja pelo uso de adjuntos a base de milho, já que esta é uma prática comum na indústria cervejeira. A presença de fumonisinas B₁ e B₂ em cerveja foi descrita pela primeira vez por

SCOTT & LAWRENCE (1995) em cervejas comercializadas do Canadá. As concentrações encontradas foram baixas. Em outro estudo posterior, SCOTT et al. (1997) confirmaram novamente a presença destas micotoxinas em aproximadamente 40% das amostras analisadas. TORRES et al. (1998) analisaram 32 cervejas espanholas e 14 amostras foram positivas para fumonisina B₁ (43,8%). Em outro estudo, HLYWKA & BULLERMAN (1999) investigaram 29 amostras de cervejas comercializadas nos Estados Unidos e detectaram fumonisinas B₁ e B₂ em 25 das 29 amostras analisadas. No Brasil, não foi realizado até o momento nenhum estudo sobre a presença de fumonisinas em cervejas.

1.6. Patulina

A patulina pode ser produzida por diversas espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys* que podem contaminar principalmente frutas e alguns vegetais (FRÉMY et al., 1995). Originalmente foi isolada devido a suas propriedades antibióticas, contudo se mostrou altamente tóxica para plantas e animais (GAUCHER, 1979). A patulina é imunossupressora e há evidência limitada de carcinogenicidade em animais experimentais (JECFA, 1995). Quimicamente, a patulina é uma lactona heterocíclica insaturada com a estrutura exibida na Figura 5.

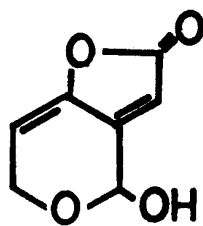


Figura 5. Estrutura química da patulina.

A patulina tem sido encontrada contaminando principalmente maçãs e pêras e seus sucos e geléias (BURDA, 1992; MACHINSKI JR & MIDIO, 1996; PLESSI et al., 1998; SYLOS & RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). A ocorrência de patulina apresenta concentrações divergentes, com valores e freqüência bastante variáveis (MACHINSKI JR & MIDIO, 1995; RODRIGUEZ-AMAYA & SABINO,

2002). No Brasil, TANIWAKI et al. (1989) não detectaram patulina em maçãs após a colheita, mas sim após o armazenamento. MACHINSKI JR & MIDIO (1996) detectaram patulina em 20% das amostras de suco de maçã comercializadas no Paraná no período de 1992 a 1993 com concentrações variando de 6 a 77 µg/Kg. Em outra avaliação realizada por SYLOS & RODRIGUEZ-AMAYA (1999) em 185 amostras de frutas e sucos, detectou-se patulina em apenas 1 amostra.

Tem-se demonstrado que a patulina é estável ao calor e a presença de ácidos (SCOTT, 1984; WHEELER et al., 1987; TANIWAKI et al., 1989). Uma avaliação limitada foi feita em produtos de tomate na Alemanha e a patulina não foi detectada (ACAR & KLAUSHOFER, 1984).

1.7. Verruculogeno

A verruculogeno (Figura 6) é uma toxina produzida por espécies de *Penicillium*, principalmente cepas de *Penicillium verruculosum* Peyronel, *Penicillium paraherquei*, *Penicillium piscarium* Westling, *Penicillium janthinellum* e espécies de *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus caespitosus* e *Aspergillus fumigatus*. *Neosartorya fischeri* também tem sido citada como uma espécie produtora de verruculogeno e é uma espécie termorresistente (TOURNAS, 1994). Seus efeitos tóxicos em animais de laboratório são tremores severos e hipersensibilidade ao som (COLE & COX, 1981). Em camundongos, a administração de verruculogeno produziu uma diminuição nos níveis de ácido γ -aminobutírico (GABA) no sistema nervoso central e este decréscimo tem sido apontado como o responsável pela indução dos tremores (COLE & KIRKSEY, 1973; UENO & UENO, 1978; COLE & COX, 1981).

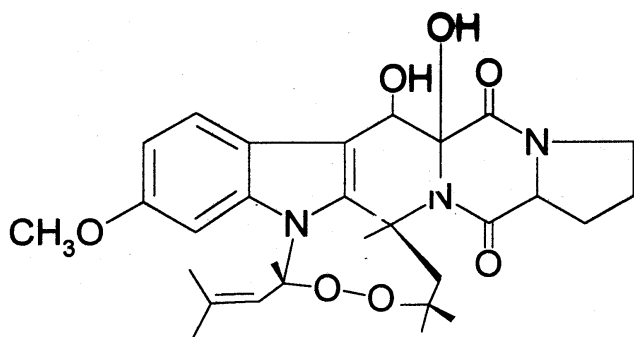


Figura 6. Estrutura química da verruculogeno.

Os relatos científicos sobre a verruculogeno são escassos. Os primeiros trabalhos são sobre o isolamento (SCHROEDER et al., 1975) e elucidação da estrutura da toxina (COLE & KIRKSEY, 1973). Há apenas alguns artigos de revisão citando a possível presença de verruculogeno em alimentos (RESHETILOVA et al., 1993; TOURNAS, 1994) e estudos sobre a produção em diferentes condições e isolamento da toxina em meios de cultura (ABD-EL-BANNA et al., 1987; NIELSEN et al., 1988; NIELSEN et al., 1989a; NIELSEN et al., 1989b).

2. Co-ocorrência de Micotoxinas

As micotoxinas têm sido associadas ao desenvolvimento de doenças com mecanismos complexos, mas deve ser considerada apenas como um dos fatores de promoção que podem incluir má-nutrição, álcool, deficiência de vitaminas, fumo, infecções (DUTTON et al., 2001; ATROSHI et al., 2002). Diversas micotoxinas podem ser veiculadas através dos alimentos e sua presença já foi largamente documentada, porém com exceção de casos agudos de intoxicação e estudos com animais (VOSS et al., 1996; CASADO et al., 2001; GELDERBLOM et al., 2002; THEUMER et al., 2003) é difícil demonstrar claramente os efeitos na população, já que além de considerarmos a possibilidade de co-ocorrência, o nível de exposição pode ser bastante variável devido a complexidade da dieta (UENO & UENO, 1978; BEARDALL & MILLER, 1994).

A contaminação de alimentos com fungos toxigênicos, dependendo das cepas e de condições ambientais, pode resultar na produção simultânea de várias micotoxinas, especialmente em cereais (BULLERMAN et al., 1984; VALENTE SOARES, 1987; MACHINSKI JR. et al., 2001). A co-ocorrência pode afetar o nível de produção de micotoxinas e a toxicidade do material contaminado (MILLER, 1991).

A ocorrência natural de fumonisinas é conhecida quase que exclusivamente em milho e produtos derivados (ALI et al., 1998). Como as condições que favorecem a formação de fumonisinas são as mesmas para a produção aflatoxinas, o milho pode estar contaminado simultaneamente com aflatoxinas,

fumonisinias, tricotecenos e zearalenona (DOKO et al., 1995; YAMASHITA et al., 1995; WANG et al., 1995; ALI et al., 1998; DUTTON, 2001). SCUDAMORE & PATEL (2000) analisaram 140 amostras de milho em grãos recebidos nos portos do Reino Unido e detectaram fumonisinias e zearalenona em quase todas as amostras (41,7 % contendo mais que 100 µg/Kg de zearalenona e 48% das amostras contendo mais de 1000 µg/Kg de fumonisinias), aflatoxinas foram detectadas em 22,9% das amostras, mas apenas 7 amostras continham mais de 4 µg/Kg, ocratoxina A teve baixa incidência e a concentração máxima encontrada foi de 1,5 µg/Kg. GONZÁLEZ et al. (1999) analisaram amostras de milho coletadas na principal região produtora de milho na Argentina em 1995 e constataram a ocorrência de fumonisinias e zearalenona em todas as amostras (fumonisinias totais com concentrações variando entre 460 a 14080 µg/Kg e zearalenona com concentrações variando entre 3000 a 7000 µg/Kg), porém não detectaram a presença de aflatoxinas e de deoxinivalenol. Tricotecenos e zearalenona foram investigados também em 54 amostras de cervejas nacionais e importadas na Coréia e foram detectados apenas deoxinivalenol e nivalenol (SHIM et al., 1997).

No Brasil, as fumonisinias também apresentam alta incidência e concentração em milho e produtos derivados (ORSI et al., 2000; MACHINSKI JR & VALENTE SOARES, 2000), mas as aflatoxinas têm uma ocorrência bem menor (VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; POZZI et al., 1995; GLÓRIA et al., 1997). POZZI et al. (1995) analisaram 130 amostras de milho do Estado de São Paulo colhidos em 1991 e apesar de verificarem a presença de *Fusarium spp* em 84% das amostras, *Penicillium spp* em 55% das amostras e *Aspergillus spp* em 41% das amostras, apenas 1 amostra estava contaminada com aflatoxina B₁, ocratoxina A, zearalenona e deoxinivalenol não foram detectadas. Zearalenona e ocratoxina A também não foram detectadas em 36 amostras de milho analisadas, mas aflatoxinas foram encontradas em 11 amostras (10-906 µg/Kg, média = 131 µg/Kg) (HENNIGEN & DICK, 1995). MACHINSKI JR et al. (2001) analisando 120 amostras de milho do Estado de São Paulo encontraram contaminação por aflatoxinas em 54,5% das amostras (6 a 1600 µg/Kg de aflatoxina B₁, média = 168 ± 339 µg/Kg), ocratoxina A foi detectada em 2 amostra (206 e 128 µg/Kg) e zearalenona em 1 amostra (4640 µg/Kg). Milho da safra 1998 produzidos no

Estado São Paulo (110 amostras) foi analisado para detectar a co-ocorrência de fumonisinas e aflatoxinas (CAMARGOS et al., 2000), a presença das fumonisinas B₁ e B₂ foi observada em todas as amostras (concentração média de fumonisina B₁ = 6790 µg/Kg e concentração média de fumonisina B₂ = 2000 µg/Kg), a aflatoxina B₁ foi detectada em 60 das 110 amostras (média = 309 µg/Kg) e as aflatoxinas B₂, G₁ e G₂ foram encontradas em 57, 12 e 8 das amostras analisadas em concentrações médias de 32, 74 e 22 µg/Kg, respectivamente.

3. Importância de Alguns Tipos de Alimentos e Bebidas no Brasil

3.1. Polpa de tomate

A indústria de derivados de tomate tem importância significativa devido ao alto consumo destes produtos. O tomate é industrializado nas mais diversas formas e é sem dúvida a hortaliça mais processada no Brasil e possivelmente no mundo (BERNHARDT, 1994). Em 1996, o Brasil movimentou cerca de R\$ 300 milhões, com uma produção de 240 mil toneladas de derivados de tomate. O produto envasado assepticamente (embalagens laminadas “Tetra Pak”) teve uma participação de 39% no mercado brasileiro (FAPESP, 1999). Em 1998, o consumo de polpa de tomate no Brasil foi de 128,2 mil toneladas (DATAMARK, 1999).

A produção mundial de tomate para processamento industrial, em 2000, foi de aproximadamente 27 milhões de toneladas. Em 2002, o Brasil produziu cerca de 1,28 milhão de toneladas, em uma área de 18,25 mil hectares. Portanto, atualmente, a produtividade média é de aproximadamente 70 toneladas por hectare (EMBRAPA, 2003b). Uma franca expansão na produção pode ser observada na Tabela 1.

O tomate possui aproximadamente 93 a 95% de água em sua composição. O restante é composto basicamente por carboidratos (65% da matéria seca), proteínas (8% da matéria seca), ácidos orgânicos e minerais (DAVIES & HOBSON, 1981). Embora as vitaminas estejam presentes em uma pequena proporção do total da matéria seca, estas substâncias são importantes do ponto de vista nutricional (Tabela 2).

Tabela 1. Área cultivada e produção brasileira de tomate industrial, 1990-2002.

Área cultivada e produção brasileira de tomate industrial, 1990-2002									
Ano	Nordeste (PE/BA)		São Paulo		Cerrado (GO/MG)		Brasil		
	Área	Produção	Área	Produção	Área	Produção	Área	Produção	t/ha
	ha	t	ha	t	ha	t	ha	t	t/ha
1990	12.422	337.000	8.260	297.400	6.410	300.000	27.092	934.400	34,6
1991	6.877	291.000	7.620	301.000	5.050	168.000	19.547	760.000	38,9
1992	4.485	190.000	7.250	287.000	9.980	230.000	16.715	707.700	42,3
1993	5.200	180.000	5.690	237.360	6.314	273.000	17.204	690.300	40,1
1994	5.836	212.000	6.380	275.480	6.184	253.000	18.400	740.000	40,2
1995	6.000	235.500	5.560	267.300	6.000	258.500	17.560	761.300	43,2
1996	6.350	259.080	4.560	226.080	5.950	264.775	16.860	749.938	44,4
1997	8.600	160.000	4.407	322.538	9.300	613.000	22.307	1.095.538	49,0
1998	6.500	130.000	4.900	250.000	9.100	637.000	20.500	1.017.000	49,6
1999	2.850	106.000	4.300	238.000	13.400	951.000	20.550	1.295.000	63,0
2000	1.370	65.000	2.040	141.000	11.450	787.500	14.860	1.059.500	66,9
2001	1.350	54.000	1.680	122.200	12.100	962.000	15.130	1.138.000	75,2
2002*	1.200	60.000	2.750	142.000	14.300	1.082.000	18.250	1.284.000	70,4

* Estimativa das indústrias

Fonte: EMBRAPA, 2003b.

Com relação ao processamento, vem ocorrendo grande diversificação de produtos derivados do tomate, procurando-se adequar as linhas de produtos às reais necessidades do público consumidor. Desse modo, a fabricação de produtos mais concentrados vem sendo gradativamente substituída pela de produtos menos concentrados e mais sofisticados em termos de sabor.

Tabela 2. Teores de vitaminas em tomate maduro.

Concentração em 100 g de fruto fresco	
Vitamina A (β -caroteno)	900 – 1271 U.I.*
Vitamina B ₁ (tiamina)	50 – 60 mg
Vitamina B ₂ (riboflavina)	20 – 50 mg
Vitamina B ₃ (ácido pantotênico)	50 – 750 mg
Vitamina do complexo B ₆	80 – 110 mg
Ácido nicotínico (niacina)	500 – 700 mg
Ácido fólico	6,4 – 20 mg
Biotina	1,2 – 4,0 mg
Vitamina C	15000 – 23000 mg
Vitamina E (α -tocoferol)	40 – 1200 mg

* 1 U.I. (Unidade Internacional) = 0,6 μ g de β -caroteno.

Fonte: DAVIES & HOBSON, 1981.

3.2. Milho

O milho é o cereal mais produzido no Brasil e o país é o terceiro produtor mundial logo após os Estados Unidos e a China, como demonstra a Tabela 3 (IBGE, 1996; FAO, 2002). Mesmo assim, importações do cereal ainda são realizadas, já que a produção nacional não é suficiente para atender as necessidades internas. A produção de milho tem acompanhado basicamente o crescimento da produção de suínos e aves, no Brasil e no mundo (EMBRAPA, 2003a). Uma variação na produção de milho no Brasil pode também ser observada (Tabela 3). A estimativa para a safra 2002/2003 é de 36.456 mil toneladas (CONAB, 2003).

O milho é caracterizado pela versatilidade de aplicações, indo desde a alimentação animal até a indústria. O uso do milho em grão na ração animal, cerca de 70% do total, constitui a maior parte do consumo desse cereal no mundo (ABIMILHO, 2003; EMBRAPA, 2003a).

Tabela 3. Produção mundial de milho.

AGRICULTURA MUNDIAL						
Principais Países Produtores						mil t
Produto	País	1997	1998	1999	2000	2001
MILHO	EUA	233.867	247.882	239.549	251.854	241.485
	CHINA	104.648	133.198	128.287	106.180	115.805
	BRASIL	32.948	29.602	32.038	31.879	41.411
	MÉXICO	17.656	18.455	17.706	17.557	18.616
	FRANÇA	16.832	15.206	15.357	16.073	16.472
	TOTAL	584.954	615.064	606.262	592.999	605.213

Fonte: FAO, 2002.

Apesar de milho em grão não ter grande participação na alimentação humana (Tabela 4), os derivados de milho são importantes para a faixa da população com baixa renda. Em algumas situações, o milho constitui a base diária de alimentação. Por exemplo, no Nordeste do Brasil, o milho é a fonte de energia para muitas pessoas que vivem no semi-árido (EMBRAPA, 2003a).

Tabela 4. Estimativa de consumo de milho em grãos no Brasil.

Uso	2001	
	(mil t)	(%)
Consumo Animal	26.366	63,5
· Avicultura	13.479	32,4
· Suinocultura	8.587	20,7
· Pecuária	2.772	6,7
· Outros Animais	1.528	3,7
Industrial	4.163	10,0
Consumo Humano	1.505	3,6
Perdas e Sementes	263	0,6
Exportação	5.629	13,6
Outros	3.613	8,7
Total	41.541	

Fontes: ABIMILHO, 2003; EMBRAPA, 2003a.

3.3.Cerveja

A bebida alcoólica de maior consumo em todo o mundo é a cerveja. O Brasil é o 4º maior produtor mundial e tem perspectivas de crescimento para os próximos anos. No mercado de cerveja, o Brasil só perde, em volume, para os Estados Unidos (23,6 bilhões de L/ano), China (15,4 bilhões de L/ano) e Alemanha (11,7 bilhões de L/ano). O consumo da bebida, em 2001, foi 2,5% superior ao do ano anterior, totalizando 8,45 bilhões de litros, segundo estimativa do SINDICERV (2002). Em relação ao consumo per capita, no entanto, o Brasil, que tem uma média de 50,3 litros/ano por habitante, está abaixo do total registrado por países como México (52 litros/ano) e Japão (57 litros/ano), como demonstra a Tabela 5.

Tabela 5. Consumo per capita de cerveja no período 1999-2000.

País	Consumo (L/ano)
Alemanha	131
Reino Unido	103
Estados Unidos	85
Espanha	66
Japão	57
México	52
Brasil	50
Argentina	33
China	15

Fonte: SINDICERV, 2002

4. Determinação de Micotoxinas em Alimentos

A metodologia analítica para a determinação de micotoxinas em alimentos geralmente é composta pelas etapas de extração, limpeza, separação, detecção, quantificação e confirmação (SCOTT, 1991). As etapas vão diferir dependendo dos equipamentos, reagentes disponíveis e dos requerimentos analíticos (sensibilidade, exatidão, precisão, tempo de análise e custo).

Tabela 6. Micotoxinas - Características físico-químicas.

Micotoxina	Fórmula Molecular	Peso Molecular	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Aflatoxina B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,06	Absorção 223, 265, 362 (etanol) Emissão 425
Aflatoxina B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,08	Absorção 220, 265, 363 (etanol) Emissão 425
Aflatoxina G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,06	Absorção 243, 257, 264, 362 (etanol) Emissão 450
Aflatoxina G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,07	Absorção 217, 245, 265, 365 (etanol) Emissão 450
Fumonisina B ₁	C ₃₄ H ₅₉ O ₁₅ N	721,84	Não absorve UV
Ocratoxina A	C ₂₀ H ₁₈ O ₆ NCl	403,08	Absorção 215, 333 (metanol) Emissão 428
Patulina	C ₇ H ₆ O ₄	154,03	Absorção 276 (etanol)
Verruculogeno	C ₂₇ H ₃₃ O ₇ N ₃	511,23	Absorção 226, 277, 295 (etanol)
Zearalenona	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	318,15	Absorção 236, 274, 316 (metanol)

Fontes: COLE & COX, 1981; SCOTT, 1993.

As micotoxinas são um grupo de substâncias que apresentam certa variabilidade nas características físico-químicas (Tabela 6) e por isso o desenvolvimento de métodos para a determinação simultânea tem sido um desafio para os analistas. Em adição, o desempenho dos métodos analíticos pode ser influenciada pela matriz do alimento, ou seja, pela composição química do alimento. Portanto, um grande número de métodos para triagem, inspeção e controle de micotoxinas em alimentos tem sido proposto. Métodos para determinação de aflatoxinas, esterigmatocistina, fumonisinas, patulina, ocratoxina A, tricotecenos e zearalenona (AOAC, 1997) em alguns tipos de alimentos já foram validados interlaboratorialmente em estudos colaborativos promovidos por organizações como AOAC International (Association of Official Analytical Chemists), AOCS (American Oil Chemists' Society), AACC (American Association of Cereal Chemists) e IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

4.1. Extração

As micotoxinas são extraídas através de misturas aquosas de solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, acetato de etila, acetona, clorofórmio e diclorometano sob agitação (BETINA, 1985; SCOTT, 1991). O objetivo desta etapa é a separação da micotoxina de interesse dos demais componentes da amostra através da solubilização com um solvente adequado. A escolha do solvente extrator depende do tipo de matriz e do sistema de limpeza e detecção a ser utilizado posteriormente (VAN EGMOND, 1996).

A patulina é extraída de alimentos quase que exclusivamente com o uso de acetato de etila (MACHINSKI JR & MIDIO, 1995). Um estudo com produtos de tomate descreve a extração da patulina com clorofórmio:metanol (97:3) seguida por limpeza em cartucho de sílica (MAFF, 1995). Outros solventes para extração utilizados para frutas e produtos de frutas, como soluções de acetato de etila-clorofórmio (WILSON, 1981) e isopropanol-acetato de etila (SIRIWARDANA & LAFONT, 1979) também são relatados, porém em trabalhos isolados.

Para a extração de fumonisinas, a solução de metanol:água (3:1) é a mais empregada (SHEPHARD et al., 1990; SCOTT & LAWRENCE, 1992; SYDENHAM et al., 1996a; CAMARGOS et al., 1999), apesar de outras proporções dos dois solventes também serem usadas. BENNETT & RICHARD (1994) e RICE et al. (1995) utilizaram solução de acetonitrila:água (1:1) para extração de fumonisinas e obtiveram bons resultados de recuperação.

O método IUPAC/AOAC para a determinação de ocratoxina A em cevada cita uma mistura de clorofórmio e ácido fosfórico (BATTALGLIA et al., 1996), para café verde, apenas o clorofórmio é empregado (AOAC, 1990). Dois métodos para a determinação de ocratoxina A em cevada (ENTWISLE et al., 2000) e café torrado (KRÄUTLER et al., 2000) foram validados recentemente. A etapa de extração de ocratoxina A em cevada foi feita com uma mistura de acetonitrila/água e o extrato foi diluído com uma solução salina tamponada de fosfato (PBS) antes da etapa de limpeza em colunas de imunoafinidade (ENTWISLE et al., 2000). Enquanto para a extração de ocratoxina A em amostras de café torrado foi empregada uma mistura (50:50) de metanol e solução aquosa 3% de bicarbonato

de sódio (KRÄUTLER et al., 2000). ZIMMERLI & DICK (1995) utilizaram clorofórmio para extração de ocratoxina A em amostras de vinho tinto.

Os relatos sobre extração de verruculogeno são de culturas de fungos produtores e a utilização de clorofórmio:metanol (2:1) é a citada nestes trabalhos (FILTENBORG et al., 1983; FRISVAD, 1987; NIELSEN et al., 1988).

O pH e a natureza química do alimento também podem exercer um efeito significativo na recuperação de micotoxinas na etapa de extração. Para a extração de ocratoxina A em cereais, a presença de ácidos melhora a recuperação (BETINA, 1985; SCOTT, 1991). Os solventes orgânicos puros ou combinados com soluções de bicarbonato de sódio e outros sais têm um efeito melhor para extração de ocratoxina A em café (TERADA et al., 1986; NAKAJIMA et al., 1990; MILANEZ et al., 1995; PITTET et al., 1996). Para fumonisinas, SCOTT & LAWRENCE (1994) verificaram que o uso de tampão borato com pH 9,2 melhorou a recuperação de fumonisinas B₁ e B₂ em produtos de milho enquanto ALBERTS et al. (1992) baixaram o pH de extração para 3,5 e conseguiram uma recuperação melhor que em pH 6 para meios de cultura. No método multi-toxinas desenvolvido por VALENTE SOARES (1987) para determinação simultânea de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina foi escolhido metanol-KCl 4% (9+1) para a extração por ser um solvente neutro possibilitando melhores condições para as micotoxinas no extrato.

4.2. Limpeza

Na etapa de extração várias substâncias presentes na matriz são co-extraídas, portanto posteriormente é necessária uma etapa de limpeza para remoção dos possíveis interferentes. Os principais procedimentos para limpeza são a partição líquido-líquido, a precipitação com adição de sais metálicos, o uso de colunas de extração em fase sólida e as colunas de imunoafinidade (BETINA, 1985; GILBERT, 1993; SCOTT, 1995). Quando os imunoenaios são utilizados para a determinação da micotoxina geralmente esta etapa não é necessária, porém quando são empregados métodos físico-químicos, os procedimentos são extensivos (MORTIMER et al., 1987; SCOTT, 1995).

A limpeza do extrato para análise de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona pode incluir colunas de sílica e/ou partições utilizando combinações de solventes, com ou sem desengorduramento prévio. O desengorduramento de amostras para evitar a formação de emulsão pode ser realizado com hexano ou isoctano (BETINA, 1985; VALENTE SOARES, 1987; SCOTT, 1991).

Para a remoção de interferentes do extrato para a determinação da patulina são propostos principalmente os usos de precipitantes, como o carbonato de sódio (FORBITO & BABSKY, 1985; SCOTT et al., 1977; MOLLER & JOSEFSSON, 1980; BURDA, 1992), e colunas adsorventes de sílica gel (SCOTT, 1974; RICE, 1980; WILSON, 1981; MEYER, 1982; AOAC, 1990; MAFF, 1995).

Com relação às fumonisinas, o mais comum é a limpeza com colunas de troca aniônica forte (SAX) (SHEPHARD et al., 1990; SCOTT & LAWRENCE, 1994; VELAZQUEZ et al., 1995; CAMARGOS et al., 1999; MACHINSKI JR & VALENTE SOARES, 2000) ou colunas de fase reversa (C₁₈) e eluição com metanol:água (3:1) (ALBERTS et al., 1992; GELDERBLOM et al., 1988). As colunas de C₁₈ podem ser usadas quando as colunas SAX apresentam baixas recuperações, porém pode haver diferenças na recuperação entre marcas e lotes diferentes (BENNET & RICHARD, 1994; RICE et al., 1995). O aumento da força iônica, a manutenção do pH entre 5,8 e 6,5 e o fluxo de eluição menor que 1 mL/min são fatores que podem aumentar a recuperação quando se empregam colunas SAX para a limpeza de extratos para a determinação de fumonisinas (SYDENHAM et al., 1992b; THIEL et al., 1993; CAMARGOS et al., 1999). As colunas SAX podem ser regeneradas e reutilizadas sem diferença significativa na recuperação de fumonisinas (SYDENHAM et al., 1992b; MACHINSKI JR & VALENTE SOARES, 2000). Ultimamente, as colunas de imunoafinidade têm sido bastante exploradas devido à alta seletividade (WARE et al., 1994; SCOTT & TRUCKSSES, 1997). A limpeza com colunas de imunoafinidade tem-se mostrado eficiente na remoção de interferentes observados quando a limpeza se limitou ao uso individual ou conjunto de colunas de C₁₈ e colunas SAX (HLYWKA & BULLERMAN, 1999).

4.3. Detecção e Quantificação

As técnicas mais utilizadas para separação de micotoxinas são basicamente cromatográficas (camada delgada, líquida de alta eficiência e gasosa) e imunoensaios. Destas, a cromatografia em camada delgada é a mais simples, mas como para todas as outras técnicas físico-químicas, as etapas de amostragem, extração e limpeza são fundamentais, tendo grande participação na exatidão e precisão dos resultados (WHITAKER et al., 1998).

No caso da análise de micotoxinas, essencialmente podemos empregar métodos de triagem ou métodos quantitativos. Os métodos de triagem foram desenvolvidos devido à necessidade de rapidez de resultados, amostras negativas podem ser liberadas, eliminando-se os procedimentos de análise quantitativa e de confirmação da micotoxina.

Os métodos de triagem não quantitativos, com o objetivo apenas de indicar preliminarmente a presença de micotoxinas têm sido realizados com minicolunas, cromatografia em camada delgada (CCD) e ensaios imunológicos. As minicolunas e os ensaios imunológicos têm a desvantagem de focar uma única toxina de cada vez. As minicolunas exploram a fluorescência nativa de algumas toxinas e são utilizadas principalmente para aflatoxinas, apesar do emprego de minicolunas também para ocratoxina A e zearalenona. O limite de detecção fica entre 10-15 ng/g, porém depende também do tratamento da amostra pré-coluna (HOLADAY, 1981). A cromatografia em camada delgada tem sido freqüentemente empregada em métodos de triagem e também na separação para a quantificação de micotoxinas e vários procedimentos têm sido propostos para análises multi-toxinas (VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Os ensaios imunológicos são de simples aplicação, extremamente rápidos e específicos, porém alguns detectam a micotoxina indiretamente e são mais propensos a erros (SCOTT, 1995; WHITAKER et al., 1994), além da desvantagem do custo e menor disponibilidade comercial.

Para a determinação quantitativa de micotoxinas, a cromatografia em camada delgada tem sido muito utilizada (CROSBY, 1984), mas está sendo superada pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta ou fluorescência, a cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons,

ionização de chama ou espectrometria de massas (EM) e a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas que facilitam a confirmação de resultados analíticos (GILBERT, 1993).

Os métodos imunológicos ultimamente têm sido largamente utilizados na pesquisa de micotoxinas. A base destes métodos é a interação entre antígenos (micotoxinas) e anticorpos específicos, produzidos num organismo animal, pelos linfócitos B. Entre os métodos imunológicos, os que tem uso mais comum na análise de micotoxinas são o ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay), aprovado como método oficial para triagem de aflatoxinas (AOAC, 1997), o RIA (Radioimunoensaio) e a cromatografia de imunoafinidade (FRÉMY & CHU, 1989). Os resultados obtidos em diversos trabalhos de investigação (WHITAKER et al., 1994) que descrevem as vantagens e os inconvenientes dos métodos imunológicos indicam que a metodologia de ELISA tem demonstrado boa correlação de resultados com CCD e CLAE. A aplicação dos “kits” de método ELISA é rápida e não exige pessoal especializado em técnicas imunológicas, o que talvez tenha contribuído para sua popularização frente aos outros métodos imunológicos. As colunas de imunoafinidade são mais empregadas na etapa de limpeza das amostras em combinação com CLAE. O RIA tem uso limitado devido a complexidade do equipamento indispensável para sua aplicação além do inconveniente que envolve o trabalho com material radioativo.

A técnica cromatográfica que tem se tornado mais popular na determinação de micotoxinas é a CLAE. Muitas das toxinas podem ser detectadas por espectroscopia no ultravioleta ou fluorescência.

A separação cromatográfica em fase reversa e tratamento pré-coluna com ácido trifluoroacético ou derivação pós-coluna com iodo tem sido utilizadas para aumentar a fluorescência de aflatoxinas em fases móveis aquosas (PESTKA, 1988). Apesar de não haver diferença significativa nos resultados apresentados com CCD e CLAE para a determinação de aflatoxinas, os trabalhos com emprego de CLAE têm aumentado devido à sensibilidade e potencial de automação (SCOTT, 1991). Uma pesquisa sobre o uso de um sistema automático utilizando limpeza em colunas de imunoafinidade e CLAE/fluorescência para a análise de

aflatoxina B₁ e fumonisina B₁ confirmou a reprodutibilidade da técnica (JORDAN et al., 1994).

A metodologia para a separação e detecção de ocratoxina A tem empregado principalmente CCD/detecção sob luz UV ou CLAE/fluorescência. Para CCD utiliza-se cromatoplasmas de sílica G-60 e desenvolvimento com uma mistura de tolueno/metanol/ácido acético. Um estudo colaborativo para determinação de ocratoxina A por CLAE/fluorescência em cevada, milho, farelo de trigo e arroz usando CLAE demonstrou que o método foi adequado para amostras com concentração ≥ 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (AOAC, 1992; LARSSON & MÖLLER, 1996). A ocratoxina A também foi determinada em cervejas usando limpeza em coluna de imunoafinidade (OchraTest-T-M) e CLAE/fluorescência, o método teve limite de detecção de 3 ng/L e limite de quantificação de 10 ng/L (TAGNI et al., 2002). A CLAE-EM (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas) é uma técnica que também tem sido usada para a identificação e quantificação, JORGENSEN & VAHL (1999) empregaram CLAE/EM/EM (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas – dois espectrômetros de massas em série) após derivação da ocratoxina A para seu metil éster, as amostras foram quantificadas com o metil(d₃)éster da ocratoxina A como padrão.

Para a determinação de patulina por CLAE, o principal cuidado é avaliar o desempenho da coluna cromatográfica verificando-se a separação entre a patulina e o hidroximetilfurfural. O hidroximetilfurfural é um interferente importante para a patulina em produtos que foram processados termicamente, já que é um composto de degradação de açúcares aquecidos em soluções ácidas, mesmo diluídas (AOAC, 1997). Nenhum desenvolvimento comercial de método ELISA para patulina foi relatado, porém várias pesquisas estão em andamento procurando obter anticorpos para derivados da patulina (MCELROY & WEISS, 1993; SHEU et al., 1999). RUNDBERGET & WILKINS (2002) desenvolveram dois métodos empregando CLAE-EM e CLAE-EM-EM para a determinação simultânea de várias micotoxinas produzidas por *Penicillium*, incluindo ocratoxina A, verruculogeno e patulina, em diversos tipos de alimentos e os limites de detecção ficaram entre 5 a 70 ng/g.

As fumonisinas não fluorescem e não absorvem radiação ultravioleta, conseqüentemente para serem detectadas pelos detectores comuns de CLAE necessitam uma modificação química. Para a determinação de fumonisinas em extratos de alimentos, o mais comum é o uso de CLAE com derivação pré-coluna do grupo 2-amino usando o-ftaldialdeído (OPA) com mercaptoetanol para torná-las fluorescentes (SHEPHARD et al., 1990; SYDENHAM et al., 1992b; RICE et al., 1995; TRUCKSESS et al., 1995; CAMARGOS et al., 1999; MACHINSKI JR & VALENTE SOARES, 2000). O uso de OPA com mercaptoetanol como reagente de derivação é simples, sensível e tem boa estabilidade (SHEPHARD et al., 1990; SYDENHAM et al., 1992b). Outros reagentes de derivação usados na determinação de fumonisinas por CLAE são: fluorescamina (HOLCOMB et al., 1993), naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA) (WARE et al., 1993), 4-fluor-7-nitro-benzeno-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) (SCOTT & LAWRENCE, 1992; SCOTT & LAWRENCE, 1994). O uso de CLAE-EM para a determinação de fumonisinas tem demonstrado sensibilidade e seletividade (XIE et al., 1997; HARTL & HUMPF, 1999), porém ainda são escassos os trabalhos utilizando esta técnica. Há vários estudos comparando os resultados obtidos por ELISA e outros procedimentos para a análise de fumonisinas em milho e derivados (SHEPHARD, 1998; SCOTT, 1993). Normalmente, devido à ocorrência de reações cruzadas, o ELISA gera resultados de concentração maior que os métodos cromatográficos, apesar de terem uma boa correlação estatística, indicando sua melhor aplicabilidade para a triagem (SYDENHAM et al., 1996b). O método ELISA foi usado para determinar a ocorrência de fumonisinas em cervejas espanholas, e conseguiu-se um limite de detecção de 3 ng/mL e recuperação de 81% em amostras contaminadas artificialmente com 0-100 ng de fumonisinas/mL (TORRES et al., 1998).

A cromatografia gasosa pode ser utilizada para a determinação de micotoxinas se elas forem voláteis à temperatura da coluna, ou mais comumente se puderem ser convertidas em derivados voláteis (BETINA, 1989). Há necessidade do uso de agentes de derivação, o que nem sempre é de simples execução. A cromatografia gasosa tem sido utilizada para análise de tricotecenos e em combinação com espectroscopia de massas tem sido empregada na

determinação de zearalenona em produtos de milho, patulina em suco de maçã e para a confirmação de aflatoxinas em amendoim (SCOTT, 1991).

No Brasil, os trabalhos publicados sobre a determinação de aflatoxinas em alimentos quase que exclusivamente empregam a cromatografia de camada delgada/detecção sob luz UV. A determinação de zearalenona e ocratoxina A também segue o mesmo perfil e muitas vezes são determinadas simultaneamente por método multi-toxina (VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). As fumonisinas e a patulina são determinadas preferencialmente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (RODRIGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002).

A etapa final da determinação de micotoxinas é a confirmação. A confirmação da identidade pode ser realizada com derivações químicas, espectrometria de massas ou infravermelho. Outras técnicas como o uso de colunas de imunoafinidade na limpeza ou detecção por fluorescência já são consideradas confirmatórias (DE RUIG et al., 1989; SCOTT, 1991; VALENTE SOARES, 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL-BANNA, A.; PITT, J.I.; LEISTNER, L. Production of mycotoxins by *Penicillium* species. **Systematic-and-Applied-Microbiology**, 10(1), 42-46, 1987.
- ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias Moageiras de Milho. In: <http://www.abimilho.com.br/>, em 20/09/2003.
- ACAR, J. & KLAUSHOFER, H. Occurrence and determination of patulin in commercially tomato pastes. **Ernaehrung**, 8, 323-326, 1984.
- ALBERTS, J.F.; GELDERBLOM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; VAN SCHALKWYK, D.; BEHREND, Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, 56(6), 1729-1733, 1990.
- ALBERTS, J.F.; GELDERBLOM, W.C.A.; MARASAS, W.F.O. Evaluation of extraction and purification procedures of maleyl derivatization HPLC technique

- for the quantification of the fumonisin B mycotoxins in corn cultures. **Mycotoxin Research**, 8(1), 2-12, 1992.
- ALI, N.; SARDJONO; YAMASHITA, A.; YOSHIZAWA, T. Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. **Food Additives and Contaminants**, 15(4), 377-384, 1998.
- AMORIM, S.S.; SILVA, C.M.G.; PIRES, R.A.; SANTOS, E.A.; CASTRO, L.; SÁ, T.A. Occurrence of mycotoxins in food and feed in Brazil. In: **Official Program and Abstract Book of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin**. São Paulo, p. 141, 2000.
- AOAC International. Association of Official Analytical Chemists International. Ochratoxin A in Green Coffee 975.38, **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 1990.
- AOAC International. Association of Official Analytical Chemists International. Ochratoxin A in corn and barley 991.44, **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 1992.
- AOAC International. Association of Official Analytical Chemists International. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Edited by CUNNIFF, P. 16th ed., 3rd rev., 1997.
- ARAÚJO, A.C.P.; TELLES, D.L.; ALMEIDA, M.G.; NASCIMENTO, E.S. Determinación de aflatoxinas em cacahuetes comercializados em Recife-PE, Brasil. **Alimentaria**, 35-37, 1994.
- ATROSHI, F.; RIZZO, A.; WESTERMARCK, T.; ALI-VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, 180(2), 151-167, 2002.
- BACON, C.W. & NELSON, P.E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, 57(6), 514-521, 1994.
- BATTALGLIA R., HATZOLD T., KROES R. Guest Editorial: Conclusions from the Workshop on Ochratoxin in Food (ILSI Europe, Aix-en-Provence, 10-12 January 1996), **Food Additives and Contaminants**, 13 (supplement), 1-3, 1996.

- BEARDALL, J.M. & MILLER, J.D. Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. In: MILLER, J.D. & TRENHOLM, H.L. (eds) **Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin**, Eagan Press, 487-539, 1994.
- BENFORD, D.; BOYLE, C.; DEKANT, W.; FUCHS, R.; GAYLOR, D.W.; HARD, G.; MCGREGOR, D.B.; PITT, J.I.; PLESTINA, R.; SHEPHARD, G.; SOLFRIZZO, M.; VERGER, P.J.P.; WALKER, R. Ochratoxin A. In: **WHO Food Additives Series 47 - FAO Food and Nutrition**, paper 74, 281-415, 2001.
- BENNET, G.A. & RICHARD, J.L. Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 77(2), 501-506, 1994.
- BENNET, G.A. & RICHARD, J.L. Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. **Food Technology**, 50(5), 235-238, 1996.
- BERNHARDT, L.W. Enlatamento de hortaliças naturalmente ácidas. In: **Processamento de hortaliças**, ITAL, Manual técnico n.4, 18-32, 1994.
- BETINA, V. Thin layer chromatography of mycotoxins. **Journal of Chromatography**, 334(3), 211-276, 1985.
- BETINA, V. Chromatographic methods as tools in the field of mycotoxins. **Journal of Chromatography A**, 477(2), 187-233, 1989.
- BRERA C; MIRAGLIA M; COLATOSTI, M. Evaluation of the impact of mycotoxins on human health: Sources of errors. **Microchemical Journal**, 59 (1), 45-49, 1998.
- BULLERMAN, L. B.; SCHOEREDER, L. L.; PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, 47(8), 637-646, 1984.
- BULLERMAN, L.B. & TSAI, W.J. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, 57(6), 541-546, 1994.
- BULLERMAN, L.B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: JACKSON, L.S.; DEVRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B. (eds.) **Fumonisin in food**. Plenum Press, 27-38, 1996.
- BURDA, K. Incidence of in apple, pear, and mixed fruit products marketed in New South Wales. **Journal of Food Protection**, 55, 796-798, 1992.

- BUSBY JR, W.F. & WOGAN, G.N. Ochratoxins. In: SHANK, R.C. (ed.) **Mycotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks**. CRC Press, 129-136, 1981.
- BUTLER, W.H. Aflatoxin. In: PURCHASE, I.F.H. (ed.) **Mycotoxins**. Elsevier, 1-28, 1974.
- CALDAS, E. D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, 36(3), 319-323, 2002.
- CAMARGOS, S.M.; MACHINSKI JR, M.; VALENTE SOARES, L.M. Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 58(2), 71-79, 1999.
- CAMARGOS, S.M.; MACHINSKI JR., M.; VALENTE SOARES, L.M. Co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested Brazilian maize**, *Tropical Science*, **41 (4)**, 182-184, 2001.
- CASADO, J.M.; THEUMER, M.; MASIH, D.T.; CHULZE, S.; RUBINSTEIN, H.R. Experimental subchronic mycotoxicoses in mice: individual and combined effects of dietary exposure to fumonisins and aflatoxin B₁. **Food Chemistry Toxicology**, 39(6), 579-586, 2001.
- CASTEGNARO, M.; BARTXCH, H.; CHERNOZEMSKY, I. Endemic nephropathy and urinary tract tumors in the Balkans. **Cancer Research**, 47, 3608-3609, 1987.
- CASTEGNARO, M.; PLESTINA, R.; DIRHEIMER, G.; CHERNOZEMSKY, I.N., BARTSCH, H. (eds.) Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours. **IARC Scientific Publication**, n.115, 340p., 1991.
- CASTRO, M.F.P.P.M; VALENTE SOARES, L.M.; FURLANI, R.P.Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study. **Revista de Microbiologia**, 26 (4), 289-295, 1995.
- CAWOOD, M.E.; GELDERBLOM, W.C.A.; VLEGGAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Isolation of the fumonisin mycotoxins – a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39(11), 1958-1962, 1991.

- CHAMBERLAIN, W.J.; BACON, C.W.; NORRED, W.P.; VOSS, K.A. Levels of fumonisin B₁ in corn naturally contaminated with aflatoxins. **Food and Chemical Toxicology**, 31, 995-998, 1993.
- CHELKOWSKI, J. & LEW, H. *Fusarium* species of Liseola section occurrence in cereals and ability to produce fumonisins. **Microbiologie Aliments Nutrition**, 10, 49-53, 1992.
- COLAÇO, W.; FERRAZ, U.; ALBUQUERQUE, L. R. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de Recife, no período de 1989 a 1991. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 54(1), 1-4, 1994.
- COLE, R.J. & COX, R.M. In: **Handbook of Toxic Fungal Metabolites**. New York: Academic Press, 937p, 1981.
- COLE, R.J. & KIRKSAY, J.W. The mycotoxin verruculogen: a 6-o-methylindole. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 21, 927-929, 1973.
- COLVIN, B.M. & HARRISON, L.R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. **Mycopathologia**, 117(1-2), 79-82, 1992.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. In: <http://www.conab.gov.br>, em 20/09/2003.
- CORRÊA, T.B.S.; RODRIGUES, H.R.; VARGAS, E.A.; ASSAD, E.D.; PRADO, G.; COSTA, P.P. Evaluation of the incidence of mycotoxins in Brazilian maize. In: **Official Program and Abstract Book of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin**; São Paulo. p.134, 2000.
- CROSBY, N.T. Review of current and future analytical methods for the determination of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, 1(1), 39-44, 1984.
- CULLEN, J.M. & NEWBERNE, P.M. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. (eds.) **The Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance**. Academic Press Inc., 3-26, 1994.
- DATAMARK. **BrazilTrend'99 – Trends in the packaged goods market**, São Paulo, 197 p., 1999.
- DAVIES, J.N. & HOBSON, G.E. The constituents of tomato fruit – the influence of environment, nutrition and genotype. **CRC Critical Review of Food Science Nutrition**, 15, 205-280, 1981.

- DE RUIG, W.G.; STEPHANY, R.W.; DIJKSTRA, G. Criteria for the detection of analytes in test samples. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 72(2), 487-490, 1989.
- DOKO, M.B. & VISCONTI, A. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, 11(4), 433-439, 1994.
- DOKO, M.B.; RAPIOR, S.; VISCONTI, A.; SCHJOTH, J.E. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43, 429-434, 1995.
- DOKO, M.B.; CANET, C.; BROWN, N. SYDENHAM, E.W., MPUCHANE, S.; SIAME, B.A. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44(10), 3240-3243, 1996.
- DOLL, R. & PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of National Cancer Institute**, 66, 1191-1308, 1981.
- DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; DVORAK, T.J.; BARRON, M.E.; ROONEY, L.W. Effect of nixtamalization (alkaline cooking) on fumonisin-contaminated corn for production of masa and tortillas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48(11), 5781-5786, 2000.
- DUTTON, M.F.; CHUTURGOON, A.A.; MYBURG, R.; CHELULE, P.; COUMI, N.; PALANEE, T.; PILLAY, D. Fungal poison in South African foods – Are they killing consumers?. In: <http://www.saafofst.org.za/dutton.html>. Apresentado no SAAFoST 16th Biennial Congress, Durban, 2001.
- EMBRAPA. EMBRAPA Milho e Sorgo. Sistema de Produção, 1. In: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/milho/>, em 20/09/2003a.
- EMBRAPA. EMBRAPA Hortaliças. Sistema de Produção, 3. In: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/tomate/>, em 20/09/2003b.
- ENTWISLE, A.C.; WILLIAMS, A.C.; MANN, P.J.; SLACK, P.T. Liquid chromatographic method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley: Collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 83 (6), 1377-1383, 2000.

- FAO. Food and Agriculture Organization. In: <http://www.fao.org>, em 29/04/2002.
- FAPESP. Programa de parceria controla fungos em derivados de tomate. Inovação Tecnológica. **Notícias FAPESP** 39, 20-21, 1999.
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; SVENDSEN, J.A. Simple screening method for moulds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, 45(2), 581-585, 1983.
- FORBITO, P.R. & BABSKY, N.E. Rapid liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 68(5), 950-951, 1985.
- FRÉMY, J. M. & CHU, F. S. Immunochemicals methods of analysis for aflatoxins. In: VAN EGMOND, H.P (ed) **Micotoxins in Dairy Products**. Elsevier, 97-125, 1989.
- FRÉMY, J.M.; CASTEGNARO, M.J.J.; GLEIZES, E.; DE MEO, M.; LAGET, M. Procedures for destruction of patulin in laboratories wastes. **Food Additives and Contaminants**, 12 (3), 331-336, 1995.
- FRISVAD, J.C. High-performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. **Journal of Chromatography**, 392, 333-347, 1987.
- FURLONG, E.B.; SOARES, L.A.S.; VIEIRA, A.P.; DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos da região do Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 58, 105-111, 1999.
- GAUCHER, G.M. Mycotoxins – Their biosynthesis in fungi: Patulin and related carcinogenic lactones. **Journal of Food Protection**, 42, 810-814, 1979.
- GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N.P.J. Fumonisin – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, 54(7), 1806-1811; 1988.
- GELDERBLOM, W.C.A.; KRIEK, N.P.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, 12(7), 1247-1251, 1991.
- GELDERBLOM, W.C.; MARASAS, W.F.; LEBEPE-MAZUR, S.; SWANEVELDER, S.; VESSEY, C.J.; HALL, P.L. Interaction of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in a

- short-term carcinogenesis model in rat liver. **Toxicology**. 171(2-3), 161-173, 2002.
- GILBERT, J. Recent advances in analytical methods for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, 10(1), 37-48, 1993.
- GLÓRIA, E.M.; FONSECA, H.; SOUZA, I.M. Occurrence of mycotoxins in maize delivered to the food industry in Brazil. **Tropical Science**, 37, 107-110, 1997.
- GOLDBLATT, L.A. Mycotoxins – past, present and future... **Journal of the American Oil Chemists Society**, 54, 302A-310A, 1977.
- GONZÁLEZ, H.H.L.; MARTÍNEZ, E.J.; PACIN, A.M.; RESNIK, S.L.; SYDENHAM, E.W. Natural co-occurrence of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in field trial corn in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, 16(12), 565-569, 1999.
- HARRISON, L.R.; COLVIN, B.M., GREENE, J.T.; NEWMAN, L.E.; COLE, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2 (3), 217-221, 1990.
- HARTL, M. & HUMPF, H.U. Simultaneous determination of fumonisin B₁ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn products by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47(12), 5078-5083, 1999.
- HENNIGEN, M.R. & DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in corn in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, 12, 677-681, 1995.
- HENNIGEN, M.R.; SANCHEZ, S.; DI BENEDETTO, N.M.; LONGHI, A.; TORROBA, J.E.; VALENTE SOARES, L.M. Fumonisin levels in commercial corn products in Buenos Aires, Argentina. **Food Additives and Contaminants**, 17(1), 55-58, 2000a.
- HENNIGEN, M.R.; VALENTE SOARES, L.M.; SANCHEZ, S.; DI BENEDETTO, N.M.; LONGHI, A.; EYHÉRABIDE, G.; TORROBA, J.E.; ZANELLI, M. Fumonisin in corn hybrids Grown in Argentina for two consecutive seasons. In: DE KOE, W.J.; SAMSON, R.A.; VAN EGMOND, H.P.; GILBERT, J.; SABINO, M. (eds.)

- Proceedings of the Xth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins** – 21-25 May, Chap. 9, 331-339, 2000b.
- HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, 13, 173-183, 1996.
- HLYWKA, J.J. & BULLERMAN, L.B. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in beer. **Food Additives and Contaminants**, 16(8), 319-324, 1999.
- HOLADAY, C.E. Minicolumn chromatography: state of the art. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 58, 931A-934A, 1981.
- HOLCOMB, M.; SUTHERLAND, J.B.; CHIARELLI, M.P.; KORFMACHER, W.A.; THOMPSON JR, H.C.; LAY JR, J.O.; HANKINS, L.J.; CERNIGLIA, C.E. HPLC and FAB mass spectroscopy analysis of fumonisins B₁ and B₂ produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41(3), 357-360, 1993.
- IARC. INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs**, 56, 245-395, 1997.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário Estatístico do Brasil**, 1996.
- JACKSON, L.S.; HLYWKA, J.J.; SENTHIL, K.R.; BULLERMAN, L.B.; MUSSER, S.M. Effects of time, temperature and pH on the stability of fumonisins B₁ in an aqueous model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, 906-912, 1996a.
- JACKSON, L.S.; HLYWKA, J.J.; SENTHIL, K.R.; BULLERMAN, L.B. Effects of thermal processing on the stability of fumonisins B₂ in an aqueous model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, 1984-1987, 1996b.
- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: World Health Organization; Fifty-sixth meeting, 2001.
- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Aditives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants – Aflatoxins**. Geneva: World Health Organization; 1998.

- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: World Health Organization; 1995.
- JORDAN, L.; HANSEN, T.J.; ZABE, N.A. Automated mycotoxin analysis. **American Laboratory**, 26 (5), 20-24, 1994.
- JORGENSEN, K. & VAHL, M. Analysis of ochratoxin A in pig kidney and rye flour using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). **Food Additives and Contaminants**, 16(11), 451-456, 1999.
- KELLERMAN, T.S.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; GELDERBLOM, W.C.A.; CAWOOD, M.E.; COETZER, J.A.W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **Journal of Veterinary Research**, 57(4), 269-275, 1990.
- KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological paper n° 161**, 1. CAB International Mycological Institute, Kew, 1989.
- KRÄUTLER O.; DELAMI, C.; WIEDERMANN, G. Proficiency study ochratoxin A in coffee samples. **Proficiency Study**. Federal Institute for Food Control and Research, Vienna, September 2000.
- KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 7(3), 253-306, 1987.
- LARSSON, K. & MÖLLER, T. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in barley, wheat bran and rye by the AOAC/IUPC/NMKL method: NMKL collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 79(5), 1102-1105, 1996.
- LEONI, L.A.B.; VALENTE SOARES, L.M.; OLIVEIRA, P.L.C. Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. **Food Additives and Contaminants**, 17, 867-870, 2000.
- MACHINSKI JR, M. & MIDIO, A.F. Patulina em alimentos – Aspectos toxicológicos e analíticos. **Revista Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, 31(1), 1-19, 1995.
- MACHINSKI JR., M. & MIDIO, A.F. Incidencia de patulina en jugo de manzana industrializado. **Alimentaria**, 276, 61-64, 1996.

- MACHINSKI JR, M.; VALENTE SOARES, L.M.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 81, 1001-1007, 2001.
- MACHINSKI JR., M. & VALENTE SOARES, L.M. Fumonisin B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, 17, 875-879, 2000.
- MAFF. Survey of fruit juices and tomato products for patulin. Food Surveillance Information Sheet, 63 (June), 1995. In: <http://www.maff.gov.uk/food/infosheet/1995/no63/63patul.htm>.
- MARQUARDT, R.R. & FROHLISH, A.A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. **Journal of Animal Science**, 70, 3968-3988, 1992.
- MARTINS-MACIEL, E.R.; MACHINSKI JR, M.; PEREIRA, S.R.C. ; TAKAHACHI, G.; KEMMELMEIER, C.; NISHIYAMA, P. Incidence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* in peanuts consumed in Maringá city, Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 39(4), 807-813, 1996
- MCELROY, L.J. & WEISS, C.M. The production of polyclonal antibodies against the mycotoxin derivative patulin hemiglutarate. **Canadian Journal of Microbiology**, 39 (9), 861-863, 1993.
- MEYER, R.A. Determination of patulin in foods - proposal of a standard method. **Nahrung**, 26(4), 337-342, 1982.
- MILANEZ, T.V.; SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A. Comparison of two methods for the determination of ochratoxin A in green coffee beans. **Revista de Microbiologia**, 26(2), 79-82, 1995.
- MILLER, J.D. Significance of grain mycotoxins for health and nutrition. In: CHAMP, B.R.; HIGHLEY, E.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I. (eds) **Fungi and Mycotoxins in Stored Products**. ACIAR Proceedings n° 36, 126-135, 1991.
- MILLER, D.M. & WILSON, D.M. Veterinary diseases related to aflatoxins. In: EATON, D.L. & GROOPMAN, J.D. (eds) **The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance**, Academic Press, 347-364, 1994.

- MIROCHA, C.J. & CHRISTENSEN, C.M. Oestrogenic mycotoxins synthesized by *Fusarium*. In: PURCHASE, I.F.H. (ed.) **Mycotoxins**, Elsevier Press, 129-148, 1974.
- MOLLER, T.E. & JOSEFSSON, E. Rapid high pressure liquid chromatography of patulin in apple juice. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 63(5), 1055-1056, 1980.
- MORTIMER, D.N.; GILBERT, J.; SHEPHERD, M.J. Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxins M₁, in liquid and powdered milk using affinity column cleanup. **Journal of Chromatography**, 407, 393-398, 1987.
- MOSS, O.M. Secondary metabolism and food intoxication-moulds. **Journal of Applied Bacteriology**, Symposium Supplement 73, 80S-88S, 1992.
- MOSS, O.M. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, 13 (supplement), 5-9, 1996.
- NAKAJIMA, M.; TERADA, H.; HISADA, K.; TSOUBUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; UDA, T.; ITOH, Y.; UENO, Y. Determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products by monoclonal antibody affinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, 2, 189-195, 1990.
- NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. Growth of and Fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, 54(6), 1504-1510, 1988.
- NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. Influence of atmospheric oxygen content on growth and fumitremorgin production by a heat-resistant mold, *Neosartorya fischeri*. **Journal of Food Science**, 54(3), 679-682, 1989a.
- NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by food preservatives and organic acids. **Journal of Applied Bacteriology**, 66(3), 197-207, 1989b.
- OLIVEIRA, V.; MESQUITA, A.J.; SERAFINI, A.B.; RIBEIRO, J.L.; SILVA, M.R.R. Ocorrência de aflatoxinas B₁ e B₂ em amendoim comercializado em Goiânia, GO, Brasil. **Revista de Microbiologia**, 23(4), 319-322, 1991.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. Criterios de salud ambiental 11, **Micotoxinas**. Organización Panamericana de la Salud, 133p., 1983.

- ONO, E.Y.S.; SUGIURA, Y.; HOMECHIN, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the state of Parana, Brazil. **Mycopathology**, 147, 139-148, 1999.
- ORSI, R.B.; CORREA, B.; POZZI, C.R.; SCHAMMAS, E.A.; NOGUEIRA, J.R.; DIAS, S.M.C.; MALOZZI, M.A.B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, 36, 75-87, 2000.
- PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M.; GLEADLE, A.E. Surveillance of fumonisins in U.K. maize based foods and other cereals. **Food Additives and Contaminants**, 40, 1352-1354, 1997.
- PESTKA, J.J. Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 71(6), 1075-1081, 1988.
- PITTET, A.; PARISOD, V.; SCHELLENBERG, M. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in corn-based products from the Swiss market. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 1352-1354, 1992.
- PITTET, A.; TORNARE, D.; HUGGET, A.; VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, 3564-3569, 1996.
- PLESSI, M.; BERTELLI, D.; MONZANI, A. Valutazione del contenuto di patulina in prodotti per la prima infanzia a base di mela. **Rivista Scienza Alimentazione**, 27, 237-243, 1998.
- POZZI, C.R.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CHACON-RECHE, N.O.; MEIRELLES, M.C.A. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Additives and Contaminants**, 12, 313-319, 1995.
- PRADO, G.; MARTINS VIEIRA, M.B.C.; SANTOS, J.P.; OLIVEIRA, M.S. Ocorrência de micotoxinas em milho pós-colheita e armazenado do Estado de Minas Gerais, safra 1991. **Higiene Alimentar**, 9, 24-27, 1995.

- PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; VELOSO, T.; BARROSO, R.E.S. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 20, 192-196, 2000.
- PRELUSKY, D.B.; ROTTER, B.A.; ROTTER, R.G. Toxicology of mycotoxins. In: MILLER, J.D.; TRENHOLM, H. (eds.) **Mycotoxins in grain**. Eagan Press, 329-358, 1994.
- RESHETILOVA, T.A.; VINOKUROVA, N.G.; L'VOVA, L.S. Nitrogen-containing mycotoxins of *Aspergillus* and *Penicillium* fungi that infect grain and grain products (a review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, 29(6), 607-613, 1993.
- RICE, S.L. Patulin production by *Byssoschlamys* spp in canned grape juice. **Journal of Food Science**, 45, 485-488, 1980.
- RICE, L.G.; ROSS, P.F.; DEJONG, J.; PLATTNER, R.D.; COATS, J.R. Evaluation of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins in corn, poultry feed, and *Fusarium* culture material. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 78(4), 1002-1009, 1995.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33, 1-11, 2002.
- ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; OSWEILLER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, 56(10), 3225-3226, 1990.
- RUNDBERGET, T. & WILKINS, A.L. Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 964 (1/2), 189-197, 2002.
- SABINO, M. Micotoxinas em Alimentos. In: OGA, S. (ed.) **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 461-472, 1996.
- SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais, Parte 1. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 46(1/2), 65-71, 1986.

- SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O., GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. **Food Additives and Contaminants**, 6(3), 327-331, 1989.
- SANCHIS, V.; ABADIAS, M.; ONCINS, L.; SALA, N.; VINAS, I.; CANELA, R. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in corn-based products from the Spanish market. **Applied and Environmental Microbiology**, 60, 2147-2148, 1994.
- SCHROEDER, H.W.; COLE, R.J.; HEIN, H.Jr.; KIRKSEY, J.W. Tremorogenic mycotoxins from *Aspergillus caespitosus*. **Applied Microbiology**, 29(6), 857-858, 1975.
- SCOTT, P.M. Colaborative study of a chromatographic method for determination of patulin in apple juice. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 57(3), 621-625, 1974.
- SCOTT, P.M. Effects of food processing on mycotoxins. **Journal of Food Protection**, 47, 489-499, 1984.
- SCOTT, P.M. Methods of analysis for mycotoxins – an overview. In: ROSSEL, J.B. & PRITCHARD, J.L.R (eds) **Analysis of oilseeds, fats and fatty foods**. Elsevier, 141-184, 1991.
- SCOTT, P.M. Fumonisin. **International Journal of Food Microbiology**, 18, 257-270, 1993.
- SCOTT, P.M. Mycotoxin methodology. **Food Additives and Contaminants**, 12(2), 395-403, 1995.
- SCOTT, P.M. Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone. **Food Additives and Contaminants**, 14(4), 333-339, 1997.
- SCOTT, P.M. & LAWRENCE, G.A. Liquid chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 75(5), 829-834, 1992.
- SCOTT, P.M. & LAWRENCE, G.A. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 77(2), 541-545, 1994.
- SCOTT, P.M. & LAWRENCE, G.A. Analysis of beer for fumonisins. **Journal of Food Protection**, 58(12), 1379-1382, 1995.

- SCOTT, P.M. & TRUCKSSES, M.W. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 80(5), 941-949, 1997.
- SCOTT, P.M.; FULEKI, T; HARWIG, J. Patulin content of juice and wine produced from moldy grapes. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 25(2), 434-437, 1977
- SCOTT, P.M.; KANHERE, S.R.; LAWRENCE, G.A.; DALEY, E.F.; FARBER, J.M. Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B₁ and B₂. **Food Additives and Contaminants**, 12 (1), 31-40, 1995.
- SCOTT, P.M.; YEUNG, J.M.; LAWRENCE, G.A.; PRELUSKY, D.B. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of beer for fumonisins. **Food Additives and Contaminants**, 14, 445-450, 1997.
- SCUDAMORE, K.A. & PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives and Contaminants**, 17(5), 407-416, 2000.
- SHEPHARD, G.S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins, **Journal of Chromatography A**, 815, 31-39, 1998.
- SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLOM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, 13(10), 2077-2087, 1990.
- SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 79(3), 671-687, 1996.
- SHEU, F.; LEE, O.; SHYU, Y.T. The synthesis of antigens and the product of antibodies against patulin derivatives. **Journal of Food and Drug Analysis**, 7 (1), 65-72, 1999.
- SHIM, W.B.; KIM, J.C.; SEO, J.A.; LEE, Y.W. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Korean and imported beers, **Food Additives and Contaminants**, 14(1), 1-5, 1997.

- SINDICERV. Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. In: <http://www.sindicerv.com.br/>, em 20/11/2002.
- SIRIWARDANA, M.G. & LAFONT, P. Méthode densitométrique de dosage de la patuline dans les jus de fruits. **Journal of Chromatography**, 173, 425-428, 1979.
- SMITH, J.E.; SOLOMONS, G.; LEWIS, C.; ANDERSON, J.G. Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. **Natural Toxins**, 3, 187-192, 1995.
- STEYN, P.S. Ochratoxins and relate dihydroisocoumarins. In: BETINA, V. (ed.), **Mycotoxins: Production, Isolation, Separation and Purification**. Elsevier Science Publishers, 183-216, 1984.
- SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; STOCKENSTRÖM, S. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39, 2014-2018, 1991.
- SYDENHAM, E.W.; MARASAS, W.F.O.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; HIROOKA, E.Y. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 994-997, 1992a.
- SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G. Liquid chromatographic determination o fumonisins B₁, B₂, and B₃ in foods and feeds, **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 75(2), 313-318, 1992b.
- SYDENHAM, E.W.; STOCKENSTROM, S.; THIEL, P.G.; SHEPHARD, G.S.; KOCH, K.R.; MARASAS, W.F.O. Potential of alkaline hydrolysis for the removal of fumonisins from contaminated corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43(5), 1198-1201, 1995.
- SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P.W.; SCHALKWYK, D.J. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ e B₃ in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 79(3), 688-695, 1996a.
- SYDENHAM, E.W.; STOCKENSTROM, S.; THIEL, P.G.; RHEEDER, J.P.; DOKO, M.B.; BIRD, C.; MILLER, B.M. Polyclonal antibody-based ELISA and HPLC

- methods for the determination of fumonisins in corn: a comparative study. **Journal of Food Protection**, 59(8), 893-897, 1996b.
- SYLOS, C.M.& RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, 16, 71-74, 1999.
- TAGNI, E.K.; PONCHAUT, S.; MAUDOUX, M.; ROZENBERG, R.; LARONDELLE, Y. Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. **Food Additives and Contaminants**, 19 (12), 1169-1179, 2002.
- TANIWAKI, M.H.; BLEINROTH, E.W.; DE MARTIN, Z.J. Bolores produtores de patulina em maçã e suco industrializado. **Coletânea ITAL**, 19(1), 42-49, 1989.
- TERADA, H.; TSOUBUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 69(6), 960-964, 1986.
- THEUMER, M.G.; LOPEZ, A.G.; MASIH, D.T.; CHULZE, S.N.; RUBINSTEIN, H.R. Immunobiological effects of AFB₁ and AFB₁-FB₁ mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. **Toxicology**, 186(1-2), 159-170, 2003.
- THIEL, P.G.; SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; MARASAS, W.F.O.; NELSON, P.E.; WILSON, T.M. Levels of fumonisins B₁ and B₂ in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39(1), 109-111, 1991.
- THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLUM, W.C.A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, 117, 3-9, 1992.
- THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; SCHALKWYK, D.J. Study of reproductibility characteristics of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn: IUPAC collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 76(2), 361-366, 1993.

- TORRES, M.R.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. **International Journal of Food Microbiology**, 39(1/2), 139-143, 1998.
- TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to food and beverage industry. **Critical Reviews in Microbiology**, 20(2), 243-263, 1994.
- TRUCKSESS, M.W.; STACK, ME.; ALLEN, S.; BARRION, N. Immunoaffinity column coupled with liquid chromatography for determination of fumonisin B₁ in canned and frozen sweet corn. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 78(3), 705-710, 1995.
- UENO, Y. & UENO, I. Toxicology and Biochemistry of Mycotoxins. In: URAGUCHI, K. & YAMAZAKI, M. (eds.), **Toxicology, biochemistry and pathology of mycotoxins**. Halsted Press, 107-188, 1978.
- VALENTE SOARES, L. M. Micotoxinas: um método para análise simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas - São Paulo. **Tese Doutorado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1987.
- VALENTE SOARES, L.M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 60(1), 79-84, 2001.
- VALENTE SOARES, L.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 72, 22-26, 1989.
- VALENTE SOARES, L.M. & FURLANI, R.P.Z. Micotoxinas em milho para pipoca. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26(1/2), 33-36, 1992.
- VALENTE SOARES, L.M.; FURLANI, R.P.Z.; OLIVEIRA, P.L.C. Species related differences in Brazilian green coffee contamination by ochratoxin A. In: SERA, T.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S. (eds). **Coffee Biotechnology and Quality**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, 369-376, 2000.
- VAN EGMOND, H.P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, 13 (supplement), 11-13, 1996.

- VELAZQUEZ, C.; BLOEMENDAL, C.; SANCHIS, V.; CANELA, R. Derivation of fumonisins B₁ and B₂ with 6-aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidylcarbamate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43(6), 1535-1537, 1995.
- VIERA, A.P.; BADIALE-FURLONG, E.; OLIVEIRA, M.L.M. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 19, 221-225, 1999.
- VISCONTI, A. & DOKO, M.B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 77(2), 546-550, 1994.
- VOSS, K.A.; RILEY, R.T.; BACON, C.W.; CHAMBERLAIN, W.J., NORRED, W.P. Subchronic toxic effects of *Fusarium moniliforme* and fumonisin B₁ in rats and mice. **Natural Toxins** 4(1), 16-23, 1996.
- WANG, D.S.; LIANG, Y.X.; CHAU, N.T.; DIEU, L.D.; TANAKA, T.; UENO, Y. Natural co-occurrence of *Fusarium* toxins and aflatoxin B₁ in corn for feed in North Vietnam. **Natural Toxins**, 3, 445 – 449, 1995.
- WARE, G.M.; FRANCIS, O.; KUAN, S.S.; UMRIGAR, P.; CARMAN JR, A.; CARTER, L.; BENNETT, G.A. Determination of fumonisin B₁ in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Letters**, 26(8), 1751-1770, 1993.
- WARE, G.M.; UMRIGAR, P.; CARMAN JR, A.; KUAN, S.S. Evaluation of fumonitest immunoaffinity columns. **Analytical Letters**, 27(4), 693-715, 1994.
- WEIDENBOERNER, M. Foods and fumonisins. **European Food Research and Technology**, 212 (3), 262-273, 2001.
- WHEELER, J.L.; HARRISON, M.A.; KOEHLER, P.E. Presence and stability of patulin in pasteurized apple cider. **Journal of Food Science**, 52(2), 479-480, 1987.
- WHITAKER, T.B.; GIESBRECHT, F.G.; WU, J.; WINSTON JR, M.H.; DOWELL, F.E. Predicting the distribution of aflatoxin test results from farmers' stock peanuts. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International** 77(3), 659-666, 1994.
- WHITAKER, T.B.; TRUCKSESS, M.W.; JOHANSSON, A.S.; GIESBRECHT, F.G.; HAGLER JR, W.M.; BOWMAN, D.T. Variability associated with testing shelled

- corn for fumonisin. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 81(6), 1162-1168, 1998.
- WILSON, R.D. Surveying some apple juices for patulin. **Food Technology**, 16(6), 27-31, 1981.
- XIE, W.; MIROCHA, C.J.; CHEN, J. Detection of two naturally occurring structural isomers of partially hydrolyzed fumonisin B₁ in corn by on-line capillary liquid chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45(4), 1251-1255, 1997.
- YAMASHITA, A.; YOSHIZAWA, T.; AIURA, Y.; SANCHEZ, P.C.; DIZON, E.I.; ARIM, R.H.; SANDJONO. *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, nivalenol and zearalenone) and aflatoxins in corn from Southeast Asia. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 59, 1804 – 1807, 1995.
- ZIMMERLI, B. & DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. **Journal of Chromatography**, 666, 85-99, 1995.

Capítulo 2

THE DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR TWO MYCOTOXINS, PATULIN AND VERRUCULOGEN, AND SURVEY OF THEIR PRESENCE IN COMMERCIAL TOMATO PULP

THE DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR TWO MYCOTOXINS, PATULIN AND VERRUCULOGEN, AND SURVEY OF THEIR PRESENCE IN COMMERCIAL TOMATO PULP

Luciane M. Kawashima; Lucia M. Valente Soares*; Pilar R. de Massaguer

Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Submitted: March 16, 2001; Returned to authors for corrections: July 11, 2001; Approved: July 26, 2002

ABSTRACT

The mycotoxin patulin causes gastrointestinal distress, neurotoxic and immunotoxic effects in animals. It can be produced by several species of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssoschlamys* and it has been found in fruits, vegetables and cereals. Verruculogen is a toxin produced mainly by *Penicillium* and *Aspergillus* spp. and causes severe tremors in affected animals. Tomatoes are especially susceptible to fungi invasion and their products need to be investigated for possible mycotoxin contamination. A method for the determination of patulin and verruculogen in tomato products was developed involving an extraction with ethyl acetate, a cleanup by silica gel column and determination and confirmation by high performance liquid chromatography with diode array detector. The quantification limits of the method, defined as the minimum amount that allowed quantification and confirmation by the DAD detector, were 10 ng/g and 20 ng/g. The average recovery for patulin at five levels of addition (from 20 to 200 ng/g) was 75% and at the single level of 100 ng/g was 90%. The average recovery for verruculogen at five levels of addition (from 50 to 300 ng/g) was 54% and at the single level of 100 ng/g was 52%. The processing of two tomato plants was followed during 1996, 1997, and 1998. Eighty-four samples of tomato pulp were analyzed for patulin and verruculogen. The toxins were not detected in any of the samples.

Key words: mycotoxins, patulin, verruculogen, tomato products

INTRODUCTION

The presence of undesirable fungi growth in food products has been extensively reported in foods and it is caused by a deterioration process or by contamination due to improper handling. Fungi can produce metabolites in the foods they invade that are toxic to man and animals and for that reason these compounds are called mycotoxins. Tomatoes, a soft skinned vegetable, are highly susceptible to fungal invasion at field conditions and also during storage, transportation and processing (25). Tomato products are largely consumed in Brazil and tomatoes constitute the horticultural product with the highest plant processing volume in the country and possibly in the world (4). In 1998 the consumption of tomato paste and tomato pulp in Brazil was 138 488 tons and 128 257 tons, respectively (2).

The mycotoxin patulin may be produced by several species of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssoschlamys*. Originally, it drew researchers attention due to its antibiotic properties. However, it was rapidly shown to be highly toxic to plants and animals (13). The LD₅₀ for rats and mice ranges from 5 to 30 mg/kg b.w. (6). Patulin causes gastrointestinal distress and neurotoxic effects in rodents (16), immunotoxic effects in mice and rabbits (32), and genotoxic effects on mammalian cells (41).

Patulin has been found in apples, pears, their juices and jams (5, 20, 22, 27, 35), grapes and grape juices (31), and beets (40). It was found in fruits that exhibited brown rot, such as bananas, pineapples, grapes, peaches, and apricots, indicating that the use of unsound fruits for processing would lead to the presence of the toxin in the products (11). A limited survey was conducted in tomato products in Germany but the toxin has not

* Corresponding author. Mailing address: FEA/UNICAMP, Caixa Postal 6121. 13081-970, Campinas, SP, Brasil. E-mail: valente@fea.unicamp.br

been detected (1). Patulin was also found in peaches, apricots, bananas, strawberries, melons, tomatoes, cucumbers and carrots inoculated with *P. expansum*, *P. urticae* and *Byssosclamyces nivea* (11) and in barley inoculated with *Aspergillus clavatus* (18). The effect of processing on patulin has been extensively studied in apples. The toxin was shown to be stable to heat and to the presence of acids, however, alcoholic fermentation will destroy it (30).

Verruculogen is a toxin produced by *Penicillium* spp., such as strains of *P. verruculosum* Peyronel, *P. paraherquei*, *P. piscarium* Westling, and *P. janthinellum*; and by *Aspergillus* spp., such as strains of *A. caespitosus*, *A. fumigatus*. *Neosartorya fischeri* has also been cited as a verruculogen producer. The latter fungus species is also thermoresistant and may survive heat treatment during vegetable and fruit processing (37). Verruculogen elicits severe tremorgenic response in animals (7) and causes a drop in the levels of the γ -aminobutyric acid in the central nervous system accompanied by loss of the GABA inhibitory function in mice dosed with the toxin (8).

Tomato products in Brazil were investigated for alternariol, alternariol monomethylether, tenuazonic acid (TEA), and cyclopiazonic acid (CPA) (24). TEA and CPA were found in the samples indicating the use of tomatoes with undesirable levels of fungi invasion. Other potentially important mycotoxins for tomato products remain to be searched for. No survey of patulin and verruculogen has been conducted so far on Brazilian tomato products.

Patulin has been determined in apple juice by thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), and gas chromatography (GC). For sample extraction there is an almost universal preference for ethyl acetate. The cleanup step may involve one of the following techniques: (a) extraction with a sodium carbonate solution; (b) chromatography with Extrelut, Florisil, silica, or octadecylsilyl columns, singly or in combination of two of these columns; (c) dialysis. Confirmation of identity has been accomplished by derivatization reaction with acetic anhydride, mass spectrometry, and diode array detectors. Detection limits claimed range from 4–10 ng/g for TLC, 10–50 ng/g for GC, and 1–44 ng/g for HPLC (14, 15, 17, 19, 22, 23, 28, 34, 36, 38). Tomato products have been analyzed by extraction with ethyl acetate, followed by a Florisil column and two dimensional TLC with visualization by derivative formation with chloro-*o*-dianisidine. The reported limit of detection was 40 ng/g (1).

There are no reports on determination of verruculogen in foods. A few workers have only described its isolation from culture media (9, 26, 29).

The present work aimed at developing a method to determine patulin and verruculogen in tomato products and surveying Brazilian tomato products for the possible presence of these toxins.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Three packages of tomato pulp were collected at random from each of 14 batches during the 1996/97 tomato harvest and also outside harvest time at two tomato processing plants located in the states of São Paulo and Goiás. The sampling was repeated during 1997/98 when 14 batches were sampled. The processed tomato pulp was packaged in Tetrapak cartoons (Tetrapak) and had 8.1° Brix and pH 4.3.

Sample extraction and cleanup

The tomato pulp samples were treated with commercial pectinase (Pectinex Ultra SPL, Ovo Nordisk Fermented Ltd.). Three hundred μ L of pectinase (previously diluted to 1:10,000) were added to 20 g sample, heated to 40°C during 15 minutes and filtered through qualitative filter paper. The residue in the filter paper was pressed to remove excess water as was needed. A 5 g aliquot was collected and extracted with 10 mL ethyl acetate followed by a second extraction with 5 mL ethyl acetate. The ethyl acetate phases were collected, dried with sodium sulfate and transferred to a silica gel column (Silica gel 60, 70–230 mesh, Merck), prepared in a glass tube with 4–4.5 cm i.d. and filled to a 6 cm height and topped with 1 cm anhydrous sodium sulfate. The toxins were eluted from the column with 15 mL ethyl acetate and the eluate dried under a gentle nitrogen stream at 40°C.

High performance liquid chromatography

The dried extract was dissolved in 500 mL 10% acetonitrile-water and filtered through a filter with 0.45 μ m diameter pores (Millipore Corp.). The samples and standards were injected using a 20 μ L loop into a isocratic liquid chromatograph with diode array detector (Hewlett Packard, model 1050) with a data processing HP Chemstation LC 3D System. Individual stock solutions were prepared for the patulin and verruculogen standards (Sigma) in ethanol and the concentrations checked by ultraviolet spectrophotometry. The working solutions were prepared by diluting the stock solutions with 10% acetonitrile-water.

For the patulin determination the wavelength was set at 276 nm. The analytical column was a reverse phase C18, 5 μ m, 4.6 x 150 mm (Microsorb MV, Varian). The mobile phase was 10% acetonitrile-water at 1 mL/min. Under these conditions patulin has a retention time of 4.1 minutes. For the verruculogen determination the wavelength was set at 225 nm. The analytical column was a reverse phase C18, Spherisorb ODS-2, 5 μ m, 4.6 x 250 mm (Sigma). The mobile phase was 50% acetonitrile-water at 1 mL/min. Under these conditions verruculogen elutes at 10.3 minutes. Quantification was accomplished by external standards at 5 concentration levels. Confirmation of identity was obtained through comparison of the presumptive peaks spectra and the standards spectra obtained under the same chromatographic conditions.

Analytical quality control

Quantification limits of the method were taken as the minimum amount of the toxin detected in the product that allowed for confirmation by the diode array detector by yielding a clearly recognizable spectrum. The recovery of the method for patulin and verruculogen were tested at five levels of addition (from 20 to 200 ng/g and from 50 to 300 ng/g, respectively). The detection limits of the pure toxins by the DAD detector were measured as three times the baseline standard variation under the same conditions employed for the tomato pulp samples. A blank and a recovery test for each toxin (a sample spiked at 100 ng/g with patulin and verruculogen) were added to each series 10 of samples analyzed.

RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of analytical methods for patulin and verruculogen in tomato products

Four extraction and cleanup systems described for patulin in apple products (3, 21, 33, 39) and one described for tomato products (1) were tested as described by the authors and also in combination. The results were found inadequate. The best extraction solvent proved to be ethyl acetate, a popular solvent for the extraction of patulin from apple products. The cleanup system that worked best for tomato products was the silica gel column, not previously described for this kind of food product.

Hydroxymethylfurfural, a compound produced when sugars are heated under acidic conditions during food processing, is a common interferent to patulin during liquid chromatography. The appropriate mobile phase and column for separating both compounds were searched for among the mobile phases recommended by AOAC for patulin (3) and two brands and sizes of chromatographic columns were tested. The best combination found is the one described in the Materials and Methods section.

For the extraction and cleanup of verruculogen in tomato products there were no methods to act as a guide or a starting point. Thus, extractions used for cultures of verruculogen producing fungi were tested (10, 12, 26) but no adequate results were reached. Luckily, it was found that the same extraction solvent and cleanup system that worked for patulin in tomato products also worked for verruculogen. Chromatographic conditions mentioned for culture extracts were tried (26) but the verruculogen peak was not resolved. For the liquid chromatography step the mobile phase had to be modified to 50% acetonitrile-water in order to elute the verruculogen. On the other hand a shorter chromatographic column (15 cm) yielded better results than the longer one used for patulin (25 cm). A gradient solvent system might have solved these difficulties and eluted both compounds in the same run but the use of an isocratic pump precluded this. Under these circumstances it was chosen to chromatograph verruculogen and patulin under separate runs

in order to change columns and mobile phases as described under the Materials and Method section. However, although the two toxins were quantified and confirmed under separate chromatographic conditions the extraction and cleanup step is common to both and is greatly simplified when compared to the patulin methods previously described for apple products and the one described for tomato products. The common extraction and cleanup for the two toxins also saves a great amount of time for the analyst and reduces reagents costs.

The method developed for determination and confirmation of patulin and verruculogen in tomato products was then evaluated with recovery and reproducibility tests. The average recovery for patulin at five levels of addition (from 20 to 200 ng/g) was 75% (Table 1) and at the single level of 100 ng/g was 90% (Table 2). The average recovery for verruculogen at five levels of addition (from 50 to 300 ng/g) was 54% (Table 1) and at the single level of 100 ng/g was 52% (Table 2). The relative standard

Table 1. Recovery of patulin and verruculogen added to tomato pulp at five different levels.

Level of addition of patulin (ng/g)	Recovery (%)	Level of addition of verruculogen (ng/g)	Recovery (%)
20	43.2	50	31.5
50	66.5	75	60.0
100	78.5	100	54.3
150	93.2	200	58.7
200	92.6	300	64.0
Average	74.8	Average	53.7
sd	20.9	sd	12.9
RSD (%)	28.0	RSD (%)	24.0

Table 2. Recoveries for patulin and verruculogen added to tomato pulp samples at the single level of 100 ng/g.

Series n°	Patulin recovery (%)*	Verruculogen recovery (%)*
1	97.2	52.4
2	85.0	65.9
3	92.7	58.7
4	95.3	60.1
5	81.0	62.3
6	95.3	62.6
7	82.2	54.0
8	91.4	48.3
9	92.1	50.0
10	93.3	52.2
Average	90.6	56.7
sd	5.7	6.0
RSD (%)	6.3	10.6

deviation for 10 repetitions was 6.3 and 10.6 % for patulin and verruculogen, respectively (Table 2).

The detection limits of the DAD detector for pure standards were 6 ng/g for patulin and 3 ng/g for verruculogen. The limit of quantification was determined as the smallest quantity of the toxin that allowed confirmation by the spectrum obtained. The limit of quantification for patulin was 10 ng/g and for verruculogen was 20 ng/g. No references have been found for limits of detection for verruculogen in any food product. For patulin in tomato products there is a recent communication from the Ministry for Agriculture, Food, and Fisheries, UK, reporting a limit of detection of 20 ng/g and recoveries of 37-61% for patulin in tomato products (21).

The method developed proved to be simple due to the limited number of steps employed and the ready availability of reagents and adsorbents used when compared to other methods described for patulin in the literature with the added advantage of allowing the determination of a second mycotoxin, verruculogen. The chromatograms (Figure 1) showed no interferences at the point the toxins eluted and this was further demonstrated by the fact the spectra of the pure compounds (Figure 2) obtained during

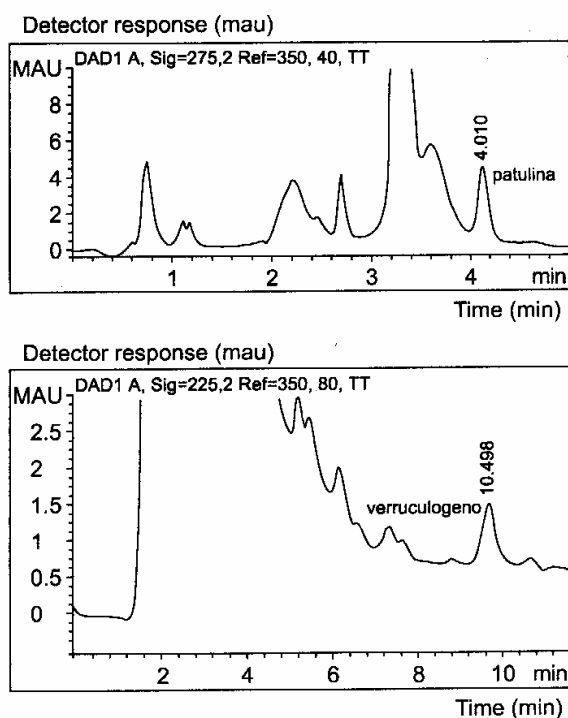


Figura 1. Chromatograms of tomato pulp samples spiked with 100 ng/g patulin and 100 ng/g of verruculogen.

the chromatographic runs were identical with the spectra of toxins spiked into the tomato pulp samples.

Survey of patulin and verruculogen in tomato products

The processing of two tomato plants were followed from 1996 to 1998 and 84 samples of tomato pulp were analyzed for patulin and verruculogen. The toxins were not detected in any of the samples.

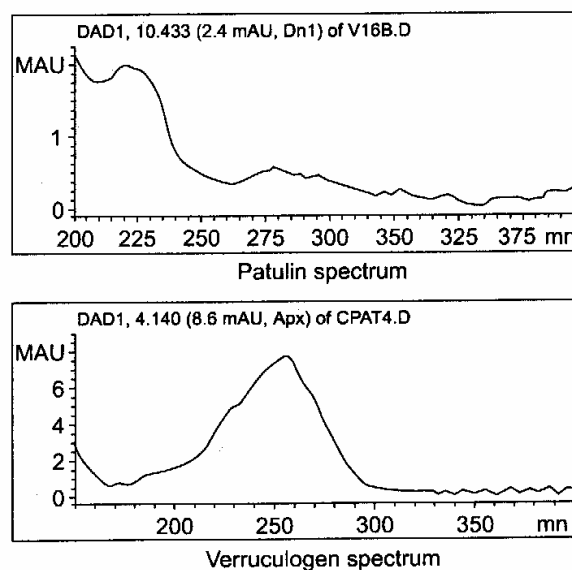


Figure 2. Patulin and verruculogen spectra taken during chromatographic run of standards.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo for the financial support and the Coordenadoria para Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for the graduate scholarship to the first author.

RESUMO

Desenvolvimento de um método analítico para duas micotoxinas, patulina e verruculogeno, e levantamento da sua incidência em polpa comercial de tomate

A micotoxina patulina causa distúrbios gastrointestinais e efeitos neurotóxicos e imunotóxicos em animais. Pode ser produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e

Byssochlamys e tem sido encontrada em frutas, verduras e cereais. Verruculogeno é uma toxina produzida principalmente por espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* e causa fortes tremores em animais afetados. Tomates são especialmente suscetíveis a invasão fúngica e seus produtos precisam ser investigados com relação a possíveis contaminações por micotoxinas. Um método para determinação de patulina e verruculogeno em produtos de tomate foi desenvolvido envolvendo uma extração com acetato de etila, uma limpeza em coluna de sílica gel e determinação e confirmação por cromatografia de alta eficiência com detector de arranjo de díodos. Os limites de quantificação foram de 10 ng/g e 20 ng/g e as recuperações médias foram de 89% e 65% para patulina e verruculogeno, respectivamente. O processamento de duas fábricas de produtos de tomate foi amostrado durante 1996, 1997 e 1998. Oitenta e quatro amostras de polpa de tomate foram analisadas para patulina e verruculogeno. As toxinas não foram detectadas em nenhuma das amostras.

Palavras-chave: micotoxinas, patulina, verruculogeno, produtos de tomate.

REFERENCES

- Acar, J.; Klaushofer, H. Occurrence and determination of patulin in commercially tomato pastes. *Ernaehrung*, 8: 323-326, 1984.
- Anonymous, BrazilTrend'99 – Trends in the packaged goods market. Datamark, São Paulo, 1999, 197p.
- AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC Int., Gaithersburg, 16th ed., 3rd rev., 1997.
- Bernhardt, L.W. *Processamento de hortaliças*. ITAL, Campinas, 1994, 70p.
- Burda, K. Incidence of in apple, pear, and mixed fruit products marketed in New South Wales. *J. Food Protec.*, 55: 796-798, 1992.
- Busby Jr., W.F.; Wogan, G.N. Patulin and penicillic acid. In: Shank, R.C. (ed). *Mycotoxins and N-nitroso compounds: Environmental risks*. Vol II. CRC Press, Boca Raton, 1981, p.121-127.
- Cole, R.G.; Cox, R.H. *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press, New York, 1981, 937p.
- Cole, R.J.; Kirksay, J.W. The mycotoxin verruculogen: a 6-o-methylindole. *J. Agric. Food Chem.*, 21: 927-929, 1973.
- El-Banna, A.; Pitt, J.I.; Leistner, L. Production of mycotoxins by *Penicillium* species. *System. Appl. Microbiol.*, 10: 42-46, 1987.
- Filtensborg, O.; Frisvad, J.C.; Svendsen, J.A. Simple screening method for moulds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 581-585, 1983.
- Frank, H.K.; Orth, R.; Figge, A. Patulin in Lebensmittel pflanzlicher Herkunft. *Z. Lebensm. Unter-Forsch.*, 163: 111-114, 1977.
- Frisvad, J.C. High-performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *J. Chromatogr.*, 392: 333-347, 1987.
- Gaucher, G.M. Mycotoxins – Their biosynthesis in fungi: Patulin and related carcinogenic lactones. *J. Food Protec.*, 42: 810-814, 1979.
- Gökmen, V.; Acar, J. Simultaneous determination of 5-hidroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 847: 69-74, 1999.
- Herry, M.P.; Lemétayer, N. Liquid chromatographic determination of patulin in French apple ciders. *J. AOAC Int.*, 79: 1107-1110, 1996.
- Hopkins, J. The toxicological hazards of patulin. *Food Chem. Toxicol.*, 31: 455-459, 1993.
- Lehman, D.; Burkard, W. Bestimmung von Patulin in Obstsaften mit Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie nach Festphasenextraktion. *De. Lebens.-Runds.*, 86: 216-217, 1990.
- Lopez-Diaz, T.; Flannigan, B. Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. *Int. J. Food Microbiol.*, 35: 129-136, 1997.
- Llovera, M.; Viladrich, R.; Torres, M.; Canela, R. Analysis of underivatized patulin by FC-MS technique. *J. Food Protec.*, 2: 202-205, 1999.
- Machinski Jr., M.; Midio, M. Incidencia de patulina en jugo de manzana industrializado. *Alimentaria*, 276: 61-64, 1996.
- Ministry of Agriculture, Food and Fisheries (MAFF, UK). Survey of fruit juices and tomato products for patulin. Food Surveillance Information Sheet, 63 (June), 1995. In: <http://www.maff.gov.uk/food/infosheet/1995/no63/63patul.htm>.
- Meyer, R.A. Zur Bestimmung von Patulin in Lebensmitteln – Vorschlag einer Standardmethode. *Nahrung*, 26: 337-342, 1982.
- Möller, T.E.; Josefsson, E. Rapid high pressure liquid chromatography of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63: 1055-1056, 1980.
- Motta, S.; Valente Soares, L.M. Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid, and cyclopiazonic acid. *Food Add. Contam.*, in press.
- Moss, M.O. Conditions and factors influencing mycotoxin formation in the field and during the storage of food. *Chem. Ind.*, 533-536, 1984.
- Nielsen, P.V.; Beuchat, L.R.; Frisvad, J.C. Growth of and Fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. *Appl. Environ. Microb.*, 54: 1504-1510, 1988.
- Plessi, M.; Bertelli, D.; Monzani, A. Valutazione del contenuto di patulina in prodotti per la prima infanzia a base di mela. *Riv. Scienza Alimentazione*, 27: 237-243, 1998.
- Roach, J.A.G.; White, K.D.; Trucksess, M.W.; Thomas, F.S. Capillary gas chromatography/mass spectrometry with chemical ionization and negative ion detection for confirmation of identity of patulin in apple juice. *J. AOAC Int.*, 83: 104-112, 2000.
- Schroeder, H.W.; Cole, R.J.; Hein Jr., H.; Kirksey, J.W. Tremorgenic mycotoxins from *Aspergillus caespitosus*. *Appl. Microbiol.*, 29: 857-858, 1975.
- Scott, P.M. Effects of food processing on mycotoxins. *J. Food Protec.*, 47: 489-499, 1984.
- Scott, P.M.; Fuleki, T.; Harwig, J. Patulin content of juice and wine produced from moldy grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 25: 434-436, 1977.
- Sharma, R.P. Immunotoxicity of Mycotoxins. *J. Dairy Sci.*, 76: 892-897, 1993.
- Siriwardana, M.G.; Lafont, P. Méthode densitométrique de dosage de la patuline dans les jus de fruits. *J. Chromatogr.*, 173: 425-428, 1979.
- Stray, H. High pressure liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61: 1359-1362, 1978.
- Sylos, C.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. *Food Add. Contam.*, 16: 71-74, 1999.
- Tarter, E.J.; Scott, P.M. Determination of patulin by capillary gas chromatography of the heptafluorobutyrate derivative. *J. Chromatogr.*, 538: 441-446, 1991.
- Tournas, V. Heat-resistant fungi of importance to food and beverage industry. *C. Rev. Microbiol.*, 20(2): 243-263, 1994.
- Ware, G.M.; Thorpe, C.W.; Pohland, A.E. Liquid chromatographic method for determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57: 1111-1113, 1974.
- Wilson, R.D. Surveying some apple juices for patulin. *Food Technol. New Zealand*, 1981, 27-31.
- Wisniewska, H.; Pirsorska-Pliszczynska, J. Natural occurrence of patulin in fodder beetroots. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 25: 1-4, 1982.
- Wouters, M.F.A.; Speijers, G.J.A. Patulin. In: *Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants*. World Health Organization, Geneva, 1996, p.337-402.

Capítulo 3

**AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE FUMONISINA B₁,
AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ e G₂, OCRATOXINA A E
ZEARALENONA EM PRODUTOS DE MILHO
COMERCIALIZADOS EM RECIFE, ESTADO DE
PERNAMBUCO**

AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE FUMONISINA B₁, AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ e G₂, OCRATOXINA A E ZEARALENONA EM PRODUTOS DE MILHO COMERCIALIZADOS EM RECIFE, ESTADO DE PERNAMBUCO

RESUMO

A ocorrência de micotoxinas em alimentos, comercializados na região Sudeste e Sul do Brasil, foi objeto de levantamentos nas últimas duas décadas. No entanto, levantamentos em alimentos comercializados em outras regiões têm-se limitado à pesquisa de aflatoxinas em amendoim e castanhas. Com o objetivo de ajudar a preencher esta lacuna, o presente trabalho pesquisou a presença de fumonisina B₁ (FB₁), aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em 74 amostras de produtos a base de milho adquiridas no comércio da cidade de Recife, PE, durante o período de 1999 a 2001. Para determinação de fumonisina B₁ utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. As demais toxinas foram determinadas por cromatografia em camada delgada. Das micotoxinas analisadas, a fumonisina B₁ foi encontrada em 94,6% das amostras em concentrações variando de 20 a 8600 µg/Kg. Apenas 5 amostras apresentaram-se positivas para a aflatoxina B₁ e o teor máximo encontrado foi 20 µg/Kg. A aflatoxina B₂ foi encontrada em 3 amostras que continham um máximo de 3 µg/Kg. Duas amostras ultrapassaram o limite de 20 µg/Kg para a somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (farinha de milho pré-cozida com 21,5 µg/Kg e quirera com 23,3 µg/Kg). As aflatoxinas G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas. Todas as amostras contaminadas com aflatoxinas também apresentaram fumonisina B₁. Não foi encontrado nenhum padrão de co-ocorrência entre as micotoxinas encontradas.

PALAVRAS-CHAVE: Micotoxinas, fumonisina, aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, milho.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais vulneráveis ao desenvolvimento de fungos toxigênicos (ZUMMO & SCOTT, 1992). As micotoxinas passíveis de serem encontradas em milho são produzidas principalmente por espécies dos gêneros *Fusarium* (fumonisinas e zearalenona), *Aspergillus* (aflatoxinas e ocratoxina) e *Penicillium* (ocratoxina) (ALI et al., 1998; ALMEIDA et al., 2000; SCUDAMORE & PATEL, 2000; MACHINSKI JR et al., 2001). Os relatos da presença de fungos toxigênicos em milho no Brasil apontam a predominância de *Fusarium*, seguido de *Penicillium* e *Aspergillus* (CASTRO et al., 1995; POZZI et al., 1995; ALMEIDA et al., 2000; ORSI et al., 2000). A presença de fungos não implica, necessariamente na presença de micotoxinas como constata o estudo de CASTRO et al. (1995). Estes autores investigaram amostras de milho do Estado de São Paulo produzidas durante o ano de 1992 e apesar de terem detectado uma extensa contaminação com fungos potencialmente tóxicos (*Fusarium* e *Penicillium* presentes em todas as amostras e *Aspergillus* em 60% das amostras), observaram a ausência de micotoxinas. Porém, em várias pesquisas realizadas com milho e derivados no exterior e no Brasil, um número considerável de amostras estavam contaminadas com micotoxinas. Os artigos mais recentes relatam principalmente a presença de fumonisinas (BULLERMAN, 1996; BULLERMAN & TSAI, 1994; DOKO & VISCONTI, 1994; SHEPHARD et al., 1996; HENNIGEN et al., 2000a; HENNIGEN et al., 2000b; MACHINSKI JR & VALENTE SOARES, 2000), mas a co-ocorrência de micotoxinas também já foi relatada em vários trabalhos (SABINO et al., 1989; VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; ALI et al., 1998; SCUDAMORE & PATEL, 2000; MACHINSKI JR et al., 2001).

O milho é o cereal mais produzido no Brasil e o país é o terceiro produtor mundial logo após os Estados Unidos e a China (IBGE, 1996; FAO, 2002). Mesmo assim, importações do cereal ainda são realizadas, já que a produção nacional não é suficiente para atender as necessidades internas.

As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram as primeiras micotoxinas a serem estudadas. Estas toxinas, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são teratogênicas, carcinogênicas, mutagênicas e possuem

efeitos tóxicos agudos, sendo o fígado o principal alvo (CASTRO et al., 1995). A aflatoxina B₁ é a mais tóxica e a mais freqüente, seguida em termos de toxicidade, respectivamente pelas aflatoxinas G₁, B₂ e G₂. Os efeitos da intoxicação aguda por aflatoxinas caracterizam-se por danos hepáticos causados em diversas espécies animais, tais como ascite, degeneração hepática, proliferação do ducto biliar e necrose hepática (BUTLER, 1974; BUSBY JR & WOGAN, 1981; CULLEN & NEWBERNE, 1994).

As aflatoxinas ocorrem principalmente em amendoim, mas vários trabalhos relatam também a contaminação de milho no Sudeste do Brasil (SABINO et al., 1989; VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; VALENTE SOARES & FURLANI, 1992; GLÓRIA et al., 1997). Em outras regiões do país, as aflatoxinas foram pesquisadas com resultados positivos em amendoim comercializado em Goiânia, GO (OLIVEIRA et al., 1991) e em Recife, PE (COLAÇO et al., 1994; ARAÚJO et al., 1994). Amostras de castanha do Pará foram examinadas para a presença de aflatoxinas em Fortaleza, CE, com resultados negativos (FREIRE et al., 1999).

As ocratoxinas são um grupo de substâncias com estrutura relacionada (ocratoxina A, B, C, α , éster metílico de ocratoxina A, éster metílico de ocratoxina B e éster metílico de ocratoxina C). A ocratoxina A predomina na natureza e é o composto mais tóxico da família (OMS, 1983), sendo produzida principalmente por *Aspergillus alutaceus* (*Aspergillus ocraceus*), em regiões tropicais e subtropicais, e *Penicillium verrucosum*, em regiões frias (STEYN, 1984). A chamada Nefropatia Endêmica dos Balcãs, uma disfunção renal que afeta a população da região da Bulgária, Romênia e Iugoslávia, é associada com a freqüência e a concentração elevada de ocratoxina A nos alimentos consumidos (CASTEGNARO et al., 1987). Além de apresentar ação nefrotóxica, a ocratoxina A pode causar câncer em animais de laboratório e suínos. Também possui atividade teratogênica em ratos, camundongos e cricetos (“hamsters”) (BENFORD et al., 2001). A ocratoxina A está parcialmente relacionada com o aparecimento de câncer no trato urinário em áreas de exposição crônica da Europa oriental (CASTEGNARO et al., 1991). A presença de ocratoxina A foi relatada em milho, feijão e farinha de mandioca oferecidos ao consumo no Sudeste do país (VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-

AMAYA, 1989). MACHINSKI JR et al. (2001) relataram a ocorrência de ocratoxina A em duas amostras de milho das 110 analisadas no Estado de São Paulo na safra 1997/1998. Um levantamento da presença desta toxina em milho produzido em Minas Gerais resultou em resultados negativos (SABINO et al., 1986).

A zearalenona (toxina F₂) é um metabólito secundário de várias espécies de *Fusarium*, principalmente *Fusarium graminearum*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium culmorum*. A zearalenona é um composto estrogênico, responsável pela síndrome estrogênica de suínos (MIROCHA & CHRISTENSEN, 1974; PRELUSKY et al., 1994). A puberdade precoce e a ginecomastia em humanos observadas em Porto Rico foram correlacionadas com a alta concentração de zearalenona em alimentos à base de milho (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). No Brasil, a zearalenona foi investigada em milho procedente das regiões Sul e Sudeste com resultados positivos em 5% das amostras (SABINO et al., 1989). O milho produzido em Minas Gerais foi também analisado para zearalenona com um resultado positivo em 83 amostras (SABINO et al., 1986), semelhante ao resultado encontrado por MACHINSKI JR et al. (2001) na safra 1997/1998 no Estado de São Paulo. Um outro levantamento pesquisou zearalenona em milho e produtos de milho, feijão, arroz e farinha de mandioca comercializados em Campinas, SP, com resultados negativos (VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

Recentemente, o maior foco de pesquisas na área de micotoxinas tem sido as fumonisinas, um grupo de micotoxinas de *Fusarium* produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* isolados de milho. No grupo das fumonisinas, as fumonisinas B₁, B₂ e B₃ são as mais comuns. A fumonisina B₁ é a mais importante, representando até 70% do total de fumonisinas produzidas em culturas de laboratório ou em milho naturalmente contaminado, além de ser a mais tóxica (CAWOOD et al., 1991). A fumonisina B₁ (FB₁) é um hepatocarcinógeno não genotóxico para ratos, além de ter efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos e agir no sistema imunológico destes animais (GELDERBLOM et al., 1991). A FB₁ causa leucoencefalomalácia (LEME) em cavalos (KELLERMAN et al., 1990; ROSS et al., 1990) e edema pulmonar em suínos (EPS) (HARRISON et al., 1990; COLVIN & HARRISON, 1992). Embora não exista evidência definitiva de carcinogenicidade em humanos, já foi reportado que há frequência maior de

câncer de esôfago nas regiões onde o milho é a base da dieta e os níveis de contaminação por *Fusarium* e/ou fumonisinas são altos (THIEL et al., 1992). Estudos realizados em vários países demonstram que o milho geralmente apresenta-se contaminado com fumonisinas, sendo as concentrações variáveis (BULLERMAN, 1996; BULLERMAN & TSAI, 1994; DOKO & VISCONTI, 1994; SHEPHARD et al., 1996). No Brasil, as fumonisinas B₁ e B₂ foram encontradas em alimentos à base de milho comercializados na cidade de Campinas, SP (MACHINSKI JR & VALENTE SOARES, 2000).

No Brasil, a avaliação da presença de micotoxinas em alimentos tem sido realizada principalmente no centro-sul do país. Como consequência das dimensões continentais do país existe a possibilidade de que a presença e o teor de micotoxinas em alimentos produzidos e consumidos sejam desiguais entre as diversas regiões. Investigações sobre a possível contaminação de alimentos por micotoxinas e um monitoramento para avaliar os riscos a que a população está sujeita nas diversas regiões se faz necessária.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho comumente consumidos na região nordeste do país e comercializados em Recife, PE.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS

Setenta e quatro amostras (500g) de produtos à base de milho foram adquiridas no comércio da cidade de Recife, PE, durante os anos de 1999 a 2001. Foram coletadas as seguintes amostras: canjica (9), farinha de milho (10), farinha e flocos de milho pré-cozido (31), fubá (11), milho de pipoca (1), quirera (6) e quirera fina (6).

REAGENTES E PADRÕES

- Água destilada e purificada pelo sistema Milli-Q Plus (Millipore, EUA)
- Reagentes grau analítico para extração e limpeza de amostras.
- Acetonitrila grau cromatográfico para fase móvel em CLAE.
- Padrões de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona (Sigma, EUA).

PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram trituradas em moinho de facas (modelo 3033, Perten, Brasil) até passarem por uma peneira 20 mesh, acondicionadas em sacos plásticos e estocadas a -18°C.

DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ e G₂, OCRATOXINA A E ZEARALENONA

- Extração e Limpeza

Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona foram determinadas segundo o método de VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) por cromatografia em camada delgada. Cinquenta gramas de amostra adicionadas de 270 mL de metanol e 30 mL de solução de cloreto de potássio 4% foram homogeneizadas em liquidificador por 5 minutos. Após filtração em papel de filtro qualitativo, a 150 mL do filtrado foram adicionados 150 mL de solução clarificante (sulfato de amônio 30%) e 50 cm³ de celite ou terra diatomácea. Após 5 minutos, a mistura foi novamente filtrada em papel de filtro qualitativo e 150 mL do filtrado (extrato clarificado) foram transferidos para um funil de separação. Foram adicionados 150 mL de água e seqüencialmente foram realizadas 2 partições com 10 mL de clorofórmio, agitando levemente por 3 minutos. Foram combinados 5 mL de cada partição de clorofórmio e evaporados à secura em banho a 80°C. O resíduo foi dissolvido em 200 µL de benzeno com agitação em banho de ultra-som por 1 minuto.

- Identificação e Quantificação

Para triagem, foram aplicados 10 µL de extrato em cromatoplaça de sílica gel 60 (Artigo 1.05553, Merck, Alemanha) e os padrões foram aplicados

separadamente. A placa foi colocada em cuba não saturada contendo tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (60:40:0,5). As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e a ocratoxina A foram visualizadas sob lâmpada ultravioleta 366 nm. A zearalenona foi visualizada da mesma maneira após revelação da cromatoplaça com solução a 20% de cloreto de alumínio em 75% etanol e aquecimento a 110°C por 5 minutos. As amostras com manchas de mesma coloração e valor de R_f (fator de retenção = razão entre a distância percorrida pela substância teste e a distância percorrida pela fase móvel) semelhante aos padrões foram consideradas presuntivamente positivas e foram submetidas à confirmação e à quantificação. Para confirmação da aflatoxina B₁ foi empregada a reação com ácido trifluoroacético segundo PRZYBYLSKI (1975). A ocratoxina A foi confirmada por derivação com trifluoreto de boro segundo procedimento de HUNT et al. (1980) e a zearalenona por acetilação com anidrido acético/piridina (GOLINSKI & GRABARKIEWICZ-SZCZENA, 1984). Para a quantificação, foram aplicados volumes conhecidos de amostras e padrões nas cromatoplacas. As cromatoplacas foram desenvolvidas em fases móveis específicas. Para as aflatoxinas foi usado clorofórmio/acetona (9:1 v/v), para a ocratoxina A a fase tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (5:4:1 v/v/v) e para a zearalenona, tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (60:40:0,5 v/v/v) seguida de revelação com cloreto de alumínio.

DETERMINAÇÃO DE FUMONISINA B₁

A determinação da fumonisina B₁ foi realizada segundo método de SHEPHARD et al. (1990)/AOAC Official Method 995.15 (AOAC International, 1997) com modificações segundo CAMARGOS et al. (1999) como descrito a seguir:

- Extração e Limpeza

Cinqüenta gramas de amostra foram adicionadas de 100 mL de metanol/água (3:1) e homogeneizadas em liquidificador por 5 minutos. A mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro grau qualitativo. O pH foi corrigido, quando necessário, para um pH entre 5,8-6,5 com hidróxido de sódio 1N. A limpeza foi realizada por extração em fase sólida com coluna de troca aniônica forte 10cm³/500mg (SAX, Bond Elut

LRC, Varian, EUA). A coluna foi condicionada com lavagens sucessivas com 10 mL de metanol e 10 mL de metanol/água (3:1). Foram aplicados 10 mL do extrato da amostra na coluna. A seguir foram adicionados à coluna 10 mL de metanol/água (3:1) seguidos de 6 mL de metanol. A fumonisina B₁ foi eluída com 20 mL de metanol/ácido acético glacial (95:5). O eluato foi evaporado sob fluxo de nitrogênio em banho de água a 60°C.

- Identificação e Quantificação

Os extratos das amostras foram redissolvidos em 500 µL de acetonitrila/água (1:1) e 100 µL foram derivados com 200 µL de reagente o-ftaldialdeído – OPA (dissolver 40 mg de o-ftaldialdeído em 1 mL de metanol, diluir com 5 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1M pH 10,4 e adicionar 50 µL de 2-mercaptoetanol) sob agitação em banho de ultra-som a 5-15°C por 30 segundos. A injeção foi feita após 60 segundos de reação. Foi utilizado um cromatógrafo à líquido Hewlett Packard - HP series 1050 (Hewlett Packard) com bomba isocrática, injetor tipo Rheodyne com alça de injeção de 20 µL, detector de fluorescência HP 1046 (comprimento de onda de excitação 335 nm e de emissão 440 nm) e integrador HP 3393A. As separações foram realizadas em coluna analítica Microsorb MV ODS C18, 5µm 4,6 x 150 mm (Varian, EUA) com fase móvel composta por água/acetonitrila/ácido acético glacial (54:46:1). A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção e a quantificação foi realizada por padronização externa a partir de injeções do padrão.

A regeneração das colunas de troca aniônica forte (SAX, Bond Elut LRC, Varian, EUA) foi realizada após tratamento com eluições sucessivas de 5 mL de ácido clorídrico 0,1 M e 8 mL de água destilada, segundo SYDENHAM et al. (1992).

CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICO

A cada série de 9 amostras analisadas foi incluído um teste de recuperação. No teste de recuperação, uma amostra não contaminada foi adicionada de padrão no dia anterior a extração. As concentrações de padrões adicionadas foram feitas de maneira que a amostra ficasse com: 20, 10, 20 e 10 µg/Kg de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, respectivamente, 100 µg/Kg de ocratoxina A,

1500 µg/Kg de zearalenona e 250 µg/Kg de fumonisina B₁. Os resultados das amostras foram corrigidos para a recuperação encontrada no teste incluído em cada série. Todas as amostras positivas foram analisadas em duplicata. As duplicatas foram analisadas em dias diferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As recuperações para aflatoxina B₁ variaram de 93 a 133% com uma recuperação média de 110±20%. Para aflatoxina B₂ a recuperação manteve-se constante em 137%, o mesmo ocorrendo para aflatoxina G₁ com uma recuperação de 96%. Para aflatoxina G₂ as recuperações variaram de 70 a 137% com uma recuperação média de 103±30%. A ocratoxina A apresentou recuperação média de 54±12% e zearalenona de 99±7%. VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) reportaram recuperações entre 91 a 100% para aflatoxina B₁ e 96 a 107% para zearalenona em fubá. Para ocratoxina A em fubá, em outra pesquisa foi obtida recuperação entre 86 e 111% (VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1985). A recuperação média para fumonisina B₁ foi de 86±19% com variação entre 60 e 119% quando cartuchos SAX novos foram usados (Tabela 1) e foi de 71±12% com variação entre 50 e 87% quando cartuchos SAX regenerados foram utilizados (Tabela 2). Num estudo colaborativo do método de SHEPHARD et al. (1990), 12 laboratórios participantes obtiveram recuperações de 81 a 84% para fumonisina B₁ (SYDENHAM et al., 1996). MACHINSKI JR. & VALENTE SOARES (2000) obtiveram recuperação de 60 a 110% (média de 80%) com o método usado no presente trabalho. O método utilizado para a determinação de fumonisina B₁ demonstrou boa resolução do pico nos cromatogramas (Figuras 1 – 3).

Os limites de detecção encontrados durante a utilização do método de VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) foram 1 µg/Kg para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, 10 µg/Kg para ocratoxina A e 50 µg/Kg para zearalenona. Os limites de detecção foram estabelecidos determinando a menor quantidade da toxina que pode ser visualizada na cromatoplaça em um extrato de produto de milho. O limite de detecção para fumonisina B₁ utilizando o método de

Tabela 1. Recuperação de fumonisina B₁ em produtos de milho contaminados artificialmente com 250 µg/Kg de fumonisina B₁ como controle nas análises realizadas segundo o método de SHEPHARD et al. (1990)/AOAC Official Method 995.15 (AOAC International, 1997) com modificações segundo CAMARGOS et al. (1999) com cartuchos SAX em primeiro uso.

Produto	Recuperação (%)
Fubá	92,6
Fubá	86,5
Flocos de milho pré-cozidos	59,0
Flocos de milho pré-cozidos	63,8
Farinha de milho	101,0
Farinha de milho	98,0
Farinha de milho pré-cozida	86,0
Quirera fina (Xerém)	118,8
Quirera	61,6
Milho p/ canjica (munguzá)	90,8

Tabela 2. Recuperação de fumonisina B₁ em produtos de milho contaminados artificialmente com 250 µg/Kg de fumonisina B₁ como controle nas análises realizadas segundo o método de SHEPHARD et al. (1990)/AOAC Official Method 995.15 (AOAC International, 1997) com modificações segundo CAMARGOS et al. (1999) com cartuchos SAX em segundo uso.

Produto	Recuperação (%)
Fubá	73,7
Fubá	68,9
Flocos de milho pré-cozidos	48,9
Flocos de milho pré-cozidos	55,6
Farinha de milho	84,5
Farinha de milho	87,0
Farinha de milho pré-cozida	73,6
Quirera fina (Xerém)	75,3
Milho p/ canjica (munguzá)	69,9

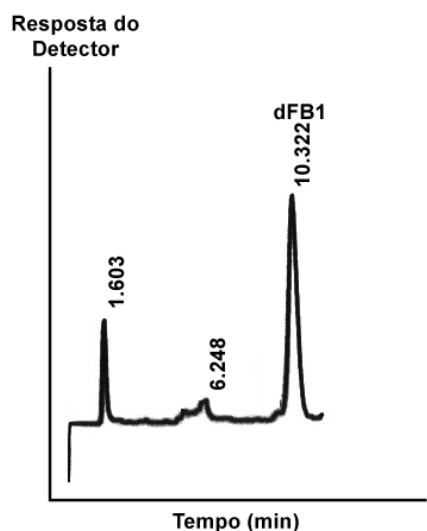


Figura 1. Cromatograma de padrão de Fumonisina B₁ (concentração= 2,7µg/mL) após derivação com reagente o-ftaldialdeído/2-mercaptoetanol. Condições cromatográficas: coluna analítica Microsorb MV ODS C18, 5µm 4,6 x 150 mm, fase móvel composta por água:acetonitrila: ácido acético glacial (54:46:1) num fluxo de 1 mL/min e detecção com comprimento de onda de excitação 335 nm e emissão 440 nm.

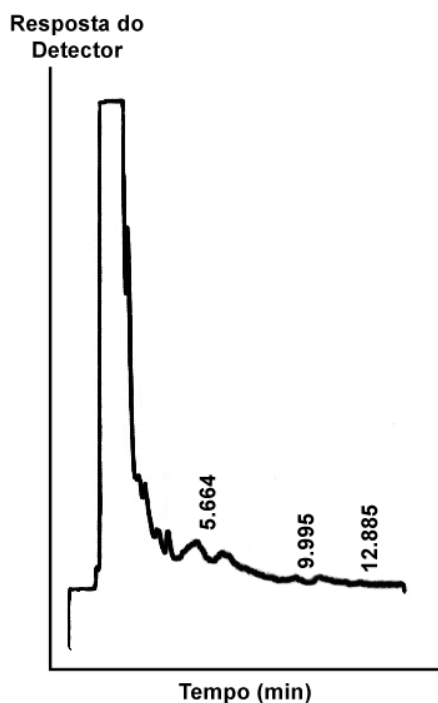


Figura 2. Cromatograma de uma amostra de fubá não contaminada com Fumonisina B₁. Reagente de derivação: o-ftaldialdeído/2-mercaptoetanol. Condições cromatográficas: coluna analítica Microsorb MV ODS C18, 5µm 4,6 x 150 mm, fase móvel composta por água:acetonitrila: ácido acético glacial (54:46:1) num fluxo de 1 mL/min e detecção com comprimento de onda de excitação 335 nm e emissão 440 nm.

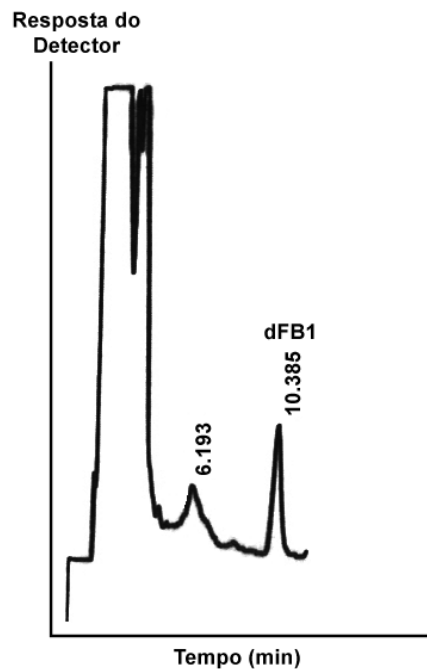


Figura 3. Cromatograma de uma amostra de flocos de milho pré-cozido contaminada com Fumonissina B₁ (concentração = 200 µg/Kg). Reagente de derivação: o-ftaldialdeído/2-mercaptoetanol. Condições cromatográficas: coluna analítica Microsorb MV ODS C18, 5µm 4,6 x 150 mm, fase móvel composta por água:acetonitrila: ácido acético glacial (54:46:1) num fluxo de 1 mL/min e detecção com comprimento de onda de excitação 335 nm e emissão 440 nm.

SHEPHARD et al. (1990) modificado por CAMARGOS et al. (1999) foi de 2,4 µg/Kg. O limite de detecção foi determinado como sendo 3 vezes a média de desvios padrão entre injeções de 8 amostras diferentes com concentração do analito ao redor de 15 µg/Kg. O limite de quantificação foi estabelecido como sendo 5 vezes o limite de detecção e nas condições de trabalho foi de 12 µg/Kg.

Das micotoxinas pesquisadas, a fumonissina B₁ foi a mais freqüentemente encontrada, ocorrendo em 71 das 74 amostras analisadas em concentrações variando de 20 a 8600 µg/Kg (Tabela 3). A concentração média de fumonissina B₁ nas 74 amostras analisadas foi 590 µg/Kg e considerando apenas as positivas, a concentração média foi de 615 µg/Kg. Entre as amostras positivas, as concentrações mais altas foram encontradas em fubá (média = 2700 µg/Kg e máximo = 8600 µg/Kg), em apenas uma das amostras de fubá não foi detectada a presença de fumonissina B₁, confirmando valores já encontrados em trabalhos anteriores (SYDENHAM et al., 1991;

Tabela 3. Ocorrência de micotoxinas em amostras de produtos de milho comercializados de 1999 a 2001 em Recife, Estado de Pernambuco. As análises para determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona foram realizadas segundo o método de VALENTE SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) por cromatografia em camada delgada e para a determinação de fumonisina B₁ foi empregado o método de SHEPHARD et al. (1990)/AOAC Official Method 995.15 (AOAC International, 1997) com modificações segundo CAMARGOS et al. (1999) por cromatografia líquida de alta eficiência/fluorescência.

Produtos	Incidência (n° positivas/total)			FB1			Afla B1			Afla B2		
	FB1	Afla B1	Afla B2	variação (µg/Kg)	média positivas (µg/Kg)	média total (µg/Kg)	variação (µg/Kg)	média positivas (µg/Kg)	média total (µg/Kg)	variação (µg/Kg)	média positivas (µg/Kg)	média total (µg/Kg)
Canjica (munguzá)	9/9	1/9	nd	20 - 530	190	190	nd - 16	16	1,7	nd	nd	nd
Farinha de Milho	10/12	nd	nd	nd - 150	73	61	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Farinha e Flocos de Milho Pré- cozidos	29/29	1/29	1/29	60 - 870	370	370	nd - 20	20	0,7	nd - 1	1	0,04
Fubá	10/11	nd	nd	nd - 8600	2700	2400	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Milho de Pipoca	1/1	nd	nd	21	21	21	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quirera	6/6	2/6	1/6	30 - 1400	410	410	nd - 20	16,3	5,4	nd - 3	3	0,5
Quirera Fina (Xerém)	6/6	1/6	1/6	20 - 400	230	230	nd - 11	11	1,8	nd - 1	1	0,2
Total	71/74	5/74	3/74	nd - 8600	615	590	nd - 20	16	1	nd - 3	2	0,07

nd - não detectado

Limites de Detecção: aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ = 1 µg/Kg;

ocratoxina A = 10 µg/Kg;

zearalenona = 50 µg/Kg e

fumonisina B₁ = 12 µg/Kg

DOKO & VISCONTI, 1994; MACHINSKI JR. & VALENTE SOARES, 2000). A concentração média é equivalente à relatada por SYDENHAM et al. (1991) de 2380 µg/Kg em fubá no Egito, por DOKO & VISCONTI (1994) de 2350 µg/Kg na Itália e MACHINSKI JR. & VALENTE SOARES (2000) de 2290 µg/Kg no Brasil. Quirera e farinha e flocos de milho pré-cozidos vêm em seguida, com concentrações médias das amostras positivas com valores de 410 e 370 µg/Kg, respectivamente. A concentração média das amostras de farinha e flocos de milho pré-cozidos contaminadas com fumonisina B₁ está abaixo da encontrada por MACHINSKI JR. & VALENTE SOARES (2000) que foi de 1260 µg/Kg, porém o número de amostras (n = 6) e o período de coleta (março - maio de 1999) foram menores. As menores concentrações médias encontradas foram nas amostras de quirera fina (230 µg/Kg), canjica (190 µg/Kg), farinha de milho (73 µg/Kg) e na única amostra de milho de pipoca (21 µg/Kg).

No Brasil ainda não temos um limite estabelecido para concentração de fumonisinas em alimentos. O JECFA (2001) recomenda uma ingestão tolerável provisória diária máxima para fumonisinas B₁, B₂, B₃, sozinhas ou combinadas, de 2 µg por Kg de peso corpóreo. O consumo de milho e produtos de milho pela população brasileira é baixo. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística informam que o consumo de fubá no Brasil em áreas metropolitanas variava de 2 a 12 g/dia/*per capita* e em áreas rurais entre 11 a 39 g/dia/*per capita* em 1977 (IBGE, 1977). A Pesquisa de Orçamentos Familiares de 1996 (IBGE, 1996) informa que o consumo diário médio de produtos de milho seco é atualmente de 8,1 g/*per capita*. O fubá apresenta os teores mais altos de fumonisina B₁ mas mesmo assim não apresenta risco para consumidores médios do produto no Brasil e apenas grandes consumidores estariam em situação de risco.

Com relação as aflatoxinas B₁ e B₂, 5 amostras apresentaram-se positivas para aflatoxina B₁ (máximo = 20 µg/Kg) e apenas 3 amostras foram positivas para aflatoxina B₂ (máximo = 3 µg/Kg). As aflatoxinas G₁ e G₂ não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas. No Brasil, em concordância com o estabelecido para o Mercosul (Resolução GMC nº 25/02), a presença de aflatoxinas em milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído) e farinhas ou sêmolos de milho é regulamentada pela Resolução - RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002, publicada no D.O.U de 16/10/2002, que estabelece o limite máximo de 20 µg/Kg para a somatória das

aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (ANVISA, 2002). Das amostras analisadas, duas ultrapassariam o limite máximo permitido, uma de farinha de milho pré-cozida (21,5 µg/Kg) e uma de quirera (23,3 µg/Kg).

Quanto a co-ocorrência, a amostra de milho para canjica (munguzá) mais contaminada com fumonisina B₁ (530 µg/Kg) foi a única que também apresentou aflatoxina B₁ (15,7 µg/Kg). No caso das amostras de quirera fina (xerém) quase o mesmo pode ser observado, uma das amostras mais contaminadas com fumonisina B₁ (320 µg/Kg) também foi a única contaminada com aflatoxinas B₁ e B₂ (11 e 1,2 µg/Kg, respectivamente). Mas, este padrão não pode ser observado nas outras amostras com co-ocorrência das micotoxinas, as 2 amostras de quirera e 1 amostra de farinha de milho pré-cozida que estavam contaminadas com aflatoxinas apresentaram concentrações abaixo da média das amostras positivas para fumonisina B₁. A amostra de quirera com maior concentração de fumonisina B₁ (1400 µg/Kg) não apresentou níveis detectáveis de aflatoxinas e as amostras de fubá que apresentaram a maior média de contaminação por fumonisina B₁ (2400 µg/Kg) também foram negativas para as outras micotoxinas analisadas.

ALI et al. (1998), na Indonésia, encontraram co-ocorrência de fumonisina B₁ em todas as amostras de milho contaminadas com aflatoxinas, o que também foi confirmado pelo presente trabalho. Porém, a presença de aflatoxinas (6,7%) foi bem menor que a relatada por ALI et al. (1998) que encontraram 69% das 16 amostras contaminadas. MACHINSKI JR et al. (2001), no Brasil, relataram 54,5% das amostras contaminadas e SCUDAMORE & PATEL (2000), em um estudo realizado no Reino Unido, constaram que 22,9 % das amostras analisadas estavam contaminadas com aflatoxinas.

A ocratoxina A e a zearalenona não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas. SCUDAMORE & PATEL (2000) encontraram ocratoxina A em 10% das 140 amostras de milho não processado analisadas, mas num valor máximo de 1,5 µg/Kg, que está bem abaixo do limite de detecção do método utilizado no presente trabalho. Na pesquisa de SCUDAMORE & PATEL (2000), a zearalenona foi detectada em quase todas as amostras e 41,7% das amostras contaminadas apresentaram concentrações maiores que 100 µg/Kg. ALI et al. (1998) encontraram valores bastante diferentes em milho na Indonésia, de 16 amostras analisadas apenas

2 apresentaram zearalenona (11 e 12 µg/Kg). MACHINSKI JR et al. (2001) analisaram 110 amostras de milho do Estado de São Paulo e encontraram ocratoxina A em apenas 2 amostras (128 e 206 µg/Kg) e zearalenona em 1 amostra (4640 µg/Kg.). A correlação entre as concentrações de micotoxinas encontradas em milho não processado e produtos de milho não é clara, mas há evidências que os produtos processados apresentam concentrações mais baixas. Uma limpeza inicial do milho em moinhos mostrou uma redução de 40% na concentração de aflatoxinas e de 32% para fumonisinas (SCUDAMORE & PATEL, 2000).

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos nesta pesquisa, 4 amostras de fubá e 1 amostra de quirera ultrapassaram 1000 µg/Kg FB₁, totalizando 6,75% das amostras analisadas. Apesar de algumas amostras de fubá e quirera apresentarem teores elevados de fumonisina B₁, como o consumo de milho e produtos de milho é baixo pela maioria da população, o risco para esta faixa de consumidores é baixo. Porém para crianças e grandes consumidores de produtos de milho seco como os aqui examinados, seria desaconselhado seu uso freqüente na dieta.

Com relação as aflatoxinas B₁ e B₂, apesar de apenas 5 amostras apresentaram-se positivas, 2 ultrapassaram o limite de 20 µg/Kg estabelecido na legislação brasileira para a somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, sendo uma amostra de farinha de milho pré-cozida e outra de quirera.

Todas as amostras contaminadas com aflatoxinas também apresentaram fumonisina B₁. Não foi encontrado nenhum padrão de co-ocorrência entre as micotoxinas encontradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, N.; SARDJONO; YAMASHITA, A.; YOSHIZAWA, T. Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. **Food Additives and Contaminants**, 15(4), 377-384, 1998.

- ALMEIDA, A.P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M.A.B.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L.M.V. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31, 321-326, 2000.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resoluções. In: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274_02rdc.htm, em 19/12/2002.
- AOAC International. Association of Official Analytical Chemists International. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Edited by CUNNIFF, P., 16th ed., 3rd rev., 1997.
- ARAÚJO, A.C.P; TELLES, D.L.; ALMEIDA, M.G.; NASCIMENTO, E.S. Determinación de aflatoxinas em cacahuètes comercializados em Recife-PE, Brasil. **Alimentaria**, 35-37, 1994.
- BENFORD, D.; BOYLE, C.; DEKANT, W.; FUCHS, R.; GAYLOR, D.W.; HARD, G.; MCGREGOR, D.B.; PITT, J.I.; PLESTINA, R.; SHEPHARD, G.; SOLFRIZZO, M.; VERGER, P.J.P.; WALKER, R. Ochratoxin A. In: **WHO Food Additives Series 47 - FAO Food and Nutrition paper 74**, 281-415, 2001.
- BULLERMAN, L.B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: JACKSON, L.S.; DEVRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B. (eds.) **Fumonisin in food**. Plenum Press, p.27-38, 1996.
- BULLERMAN, L.B. & TSAI, W.J. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, 57(6), 541-546, 1994.
- BUSBY JR, W.F. & WOGAN, G.N. Aflatoxins. In: SHANK, R.C. (ed.) **Mycotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks**. CRC Press, p.3-27, 1981.
- BUTLER, W.H. Aflatoxin. In: PURCHASE, I.F.H. (ed.) **Mycotoxins**. Elsevier, p.1-28, 1974.
- CAMARGOS, S.M.; MACHINSKI JR, M.; VALENTE SOARES, L.M. Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 58(2), 71-79, 1999.
- CASTEGNARO, M.; BARTXCH, H.; CHERNOZEMSKY, I. Endemic nephropathy and urinary tract tumors in the Balkans. **Cancer Research**, 47, 3608-3609, 1987.

- CASTEGNARO, M.; PLESTINA, R.; DIRHEIMER, G.; CHERNOZEMSKY, I.N., BARTSCH, H. (eds.) Mycotoxin, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. **IARC Scientific Publication**, 115, 340p., 1991.
- CASTRO, M.F.P.P.M; SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P.Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study. **Revista de Microbiologia**, 26 (4), 289-295, 1995.
- CAWOOD, M.E.; GELDERBLOM, W.C.A.; VLEGGGAAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Isolation of the fumonisin mycotoxins – a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39(11), 1958-1962, 1991.
- COLAÇO, W.; FERRAZ, U.; ALBUQUERQUE, L. R. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de Recife, no período de 1989 a 1991. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 54(1), 1-4, 1994.
- COLVIN, B.M. & HARRISON, L.R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. **Mycopathologia**, 117(1-2), 79-82, 1992.
- CULLEN, J.M. & NEWBERNE, P.M. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. (eds.) **The Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance**. Academic Press Inc., p.3-26, 1994.
- DOKO, M.B. & VISCONTI, A. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, 11(4), 433-439, 1994.
- FAO. Food and Agriculture Organization. In: <http://www.fao.org>, em 29/04/2002.
- FREIRE, F.C.O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PETERSON, R.R.M. Mycoflora and mycotoxins of Brazilian cashew kernels. **Mycopathologia**, 145, 95-103, 1999.
- GELDERBLOM, W.C.A.; KRIEK, N.P.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisins B₁, in rats. **Carcinogenesis**, 12(7), 1247-1251, 1991.
- GLÓRIA, E.M.; FONSECA, H.; SOUZA, I.M. Occurrence of mycotoxins in maize delivered to the food industry in Brazil. **Tropical Science**, 37, 107-110, 1997.
- GOLINSKI, P. & GRABARKIEWICZ-SZCZENA, J. Chemical confirmatory tests for ochratoxin A, citrinin, penicillic acid, sterigmatocystin, and zearalenone performed directly on thin layer chromatographic plates. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 67(6), 1108-1110, 1984.

- HARRISON, L.R.; COLVIN, B.M., GREENE, J.T.; NEWMAN, L.E.; COLE, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2 (3), 217-221, 1990.
- HENNIGEN, M.R.; SANCHEZ, S.; DI BENEDETTO, N.M.; LONGHI, A.; TORROBA, J.E.; VALENTE SOARES, L.M. Fumonisin levels in commercial corn products in Buenos Aires, Argentina. **Food Additives and Contaminants**, 17(1), 55-58, 2000a.
- HENNIGEN, M.R.; VALENTE SOARES, L.M.; ; SANCHEZ, S.; DI BENEDETTO, N.M.; LONGHI, A.; EYHÉRABIDE, G.; TORROBA, J.E.; ZANELLI, M. Fumonisin in corn hybrids Grown in Argentina for two consecutive seasons. In: DE KOE, W.J.; SAMSON, R.A.; VAN EGMOND, H.P.; GILBERT, J.; SABINO, M. (eds.) **Proceedings of the Xth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins** – 21-25 May, Chap. 9, 331-339, 2000b.
- HUNT, D.C.; MCCONNIE, B.R.; CROSBY, N.T. Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatisation and high-performance liquid chromatography. **Analyst**, 105, 89-91, 1980.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estudo Nacional da Despesa Familiar**, 1977.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário Estatístico do Brasil**, 1996.
- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: World Health Organization; Fifty-sixth meeting, 2001.
- KELLERMAN, T.S.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A.; CAWOOD, M.E.; COETZER, J.A.W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **Journal of Veterinary Research**, 57(4), 269-275, 1990.
- KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 7(3), 253-306, 1987.

- MACHINSKI JR, M. & VALENTE SOARES, L.M. Fumonisin B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, 17(10), 875-879, 2000.
- MACHINSKI JR, M.; VALENTE SOARES, L.M.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 81, 1001-1007, 2001.
- MIROCHA, C.J. & CHRISTENSEN, C.M. Oestrogenic mycotoxins synthesized by *Fusarium*. In: PURCHASE, I.F.H. (ed.) **Mycotoxins**, Elsevier Press, p.129-148, 1974.
- OLIVEIRA, V.; MESQUITA, A.J.; SERAFINI, A.B.; RIBEIRO, J.L.; SILVA, M.R.R. Ocorrência de aflatoxinas B₁ e B₂ em amendoim comercializado em Goiânia, GO, Brasil. **Revista de Microbiologia**, 23(4), 319-322, 1991.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. **Criterios de salud ambiental 11, Micotoxinas. Organización Panamericana de la Salud**, 133p., 1983.
- ORSI, R.B.; CORREA, B.; POZZI, C.R.; SCHAMMAS, A.E.; NOGUEIRA, J.R.; DIAS, S.M.C.; MALOZZI, M.A.B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, 36, 75-87, 2000.
- POZZI, C.R.; CORREA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CHACON-RECHE, N.O.; MEIRELLES, M.C.A. Post-harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. **Food Additives and Contaminants**, 12(3), 313-319, 1995.
- PRELUSKY, D.B.; ROTTER, B.A.; ROTTER, R.G. Toxicology of mycotoxins. In: MILLER, J.D.; TRENHOLM, H. (eds.) **Mycotoxins in grain**. Eagan Press, p.329-358, 1994.
- PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 58(1), 163-164, 1975.
- ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; OSWEILLER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia

- and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, 56(10), 3225-3226, 1990.
- SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais, Parte 1. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 46(1/2), 65-71, 1986.
- SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O., GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. **Food Additives and Contaminants**, 6(3), 327-331, 1989.
- SCUDAMORE, K.A. & PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives and Contaminants**, 17(5), 407-416, 2000.
- SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, 13, 2077-2087, 1990.
- SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 79(3), 671-687, 1996.
- STEYN, P.S. Ochratoxins and related dihydroisocoumarins. In: BETINA, V. (ed.), **Mycotoxins: Production, Isolation, Separation and Purification**. Elsevier Science Publishers, 183-216, 1984.
- SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; STOCKENSTRÖM, S. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39 (11), 2014-2018, 1991.
- SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in foods and feeds. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 75(2), 313-318, 1992.
- SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P.W.; VAN SCHALKWYK, D.J. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 79(3), 688-689, 1996.

- THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLUM, W.C.A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, 117, 3-9, 1992.
- VALENTE SOARES, L.M. & FURLANI, R.P.Z. Micotoxinas em milho para pipoca. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26(1/2), 33-36, 1992.
- VALENTE SOARES, L.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice, and cassava. **Journal of the Association of Analytical Chemists**, 68(6), 1128-1130, 1985.
- VALENTE SOARES, L.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Analytical Chemists**, 72(1), 22-26, 1989.
- ZUMMO, N. & SCOTT, G.E. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. **Plant Disease**, 76, 771-773, 1992.

Capítulo 4

AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE FUMONISINA B₁ EM CERVEJAS BRASILEIRAS

AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE FUMONISINA B₁ EM CERVEJAS BRASILEIRAS

RESUMO

As fumonisinas são um grupo de metabólitos secundários produzidos por várias espécies de *Fusarium*. Estes fungos são contaminantes comuns do milho. O uso de milho como adjunto é uma prática comum na indústria cervejeira nacional e a contaminação deste cereal pode resultar na presença de micotoxinas no produto final. Um total de 58 cervejas nacionais provenientes de nove Estados brasileiros (São Paulo, Minas Gerais, Sergipe, Pará, Pernambuco, Paraíba, Paraná, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul) e adquiridas no período de 2000 a 2001 foram analisadas para fumonisina B₁ usando concentração e limpeza em coluna de extração em fase sólida por troca iônica, seguida de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência após reação de derivação com o-ftaldialdeído. O limite de detecção foi de 0,26 ng/mL e o limite de quantificação foi de 1,3 ng/mL. As recuperações de fumonisina B₁ em amostras contaminadas artificialmente em concentrações de 5 a 50 ng/mL variaram de 70 a 121%. Vinte e cinco (43,1%) das amostras analisadas continham fumonisina B₁. O conteúdo de fumonisina B₁ das amostras positivas variou de 1 a 40 ng/mL, com uma concentração média de $9,6 \pm 10,2$ ng/mL. Considerando o consumo per capita de cerveja no Brasil (50,3 L/ano) e a ingestão diária máxima tolerável provisória de 2000 ng/Kg p.c. para fumonisina B₁, vemos que a ingestão de cerveja não apresenta risco, mesmo para grandes consumidores (650 a 1300 mL/dia). Apesar da baixa contaminação verificada, a adoção de um sistema de controle da matéria-prima nas cervejarias seria interessante, já que a contaminação de cereais por micotoxinas varia de ano para ano e assim seria possível evitar a contaminação do produto final com fumonisina.

PALAVRAS-CHAVE: micotoxinas, fumonisina, cerveja.

INTRODUÇÃO

O estudo da incidência de fumonisinas em alimentos tem demonstrado que são contaminantes comuns do milho. As fumonisinas, principalmente a fumonisina B₁, têm sido detectadas em todos os tipos de produtos derivados de milho (SYDENHAM et al., 1991; BULLERMAN, 1996; BULLERMAN & TSAI, 1994; DOKO & VISCONTI, 1994; SHEPHARD et al., 1996; PATEL et al., 1997; HENNIGEN et al., 2000a; HENNIGEN et al., 2000b; MACHINSKI JR & SOARES, 2000).

A primeira vista, uma investigação sobre a ocorrência de fumonisinas em cerveja pode parecer sem sentido, já que não é comum a contaminação de cevada por estas micotoxinas. Espécies de *Fusarium moniliforme* já foram isolados de cevada e trigo (CHELKOWSKI & LEW, 1992; VISCONTI & DOKO, 1994), mas não há evidência de produção de toxinas nestes cereais. Porém, as fumonisinas podem ser introduzidas na cerveja pelo uso de adjuntos a base de milho. O uso de milho como adjunto é uma prática comum na indústria cervejeira e se estes cereais estiverem contaminados, o resultado será a presença destas micotoxinas no produto final. A decisão sobre o uso de adjuntos nas cervejas comerciais como substituto ou aditivo ao malte de cevada é ditada pelo menor custo dos adjuntos, a disponibilidade dos grãos e/ou características desejáveis de sabor (HLYWKA & BULLERMAN, 1999). A contaminação de cervejas com fumonisinas parece estar associada ao uso de “grits” de milho ao invés de xarope de milho como adjunto na fermentação. Em amostras de amido extraído de milho (BENNETT et al., 1996) e xarope de milho (PATEL et al., 1997) não foi detectada a presença de fumonisinas.

Estudos demonstraram que a fumonisina B₁ é estável ao calor (ALBERTS et al., 1990; JACKSON et al., 1996a; JACKSON et al., 1996b) e resistente à fermentação do milho para produção de etanol (SCOTT et al., 1995). Estes fatos indicam que a ocorrência de fumonisinas em cervejas deve ser investigada.

A presença de fumonisinas em cerveja foi descrita pela primeira vez por SCOTT & LAWRENCE (1995) em cervejas comercializadas no Canadá. As concentrações encontradas foram baixas, apenas 4 das 41 amostras apresentaram concentração maior que 2 ng/mL. Em outro estudo posterior, SCOTT et al. (1997) confirmaram novamente a presença destas micotoxinas, de 46 amostras analisadas, 20 foram positivas com concentração de fumonisina B₁ e

B₂ variando de 0,2 a 64 ng/mL (média = 5,6 ± 13,6 ng/mL). Em ambos os estudos estavam incluídas cervejas canadenses e importadas porém, a origem das amostras contaminadas não foi especificada. TORRES et al. (1998) analisaram 32 cervejas espanholas e 14 amostras foram positivas para fumonisina B₁ (43,8%) com a contaminação numa faixa de 4,76 ng/mL a 85,53 ng/mL (média = 28 ± 22 ng/mL). Em outro estudo, HLYWKA & BULLERMAN (1999) investigaram 29 amostras de cervejas comercializadas nos Estados Unidos. Os autores detectaram fumonisinas B₁ e B₂ em 25 das 29 amostras (86%), com a concentração da somatória de fumonisinas B₁ e B₂ variando de 0,3 a 13,5 ng/mL.

No Brasil, não foi realizado até o momento nenhum levantamento da presença de fumonisina B₁ em cervejas. Por este motivo e devido à importância da fumonisina para a saúde humana, o presente trabalho teve como objetivos testar e validar um método para a análise de FB₁ em cervejas e realizar um levantamento da presença de FB₁ em cervejas nacionais produzidas em diversos Estados.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS

Cinquenta e oito cervejas nacionais produzidas no período 2000-2001 em nove Estados brasileiros: São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Sergipe (SE), Pará (PA), Pernambuco (PE), Paraíba (PB), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ) e Rio Grande do Sul (RS) foram adquiridas.

REAGENTES E PADRÕES

- Água destilada e purificada pelo sistema Milli-Q Plus (Millipore, EUA)
- Solventes e reagentes grau analítico para extração, limpeza e derivação.
- Acetonitrila grau cromatográfico utilizada para a análise cromatográfica
- Padrão de fumonisina B₁ (Sigma, EUA).

PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras tiveram o pH corrigido (entre 5,8 - 6,5) com hidróxido de sódio 1N e foram filtradas em papel de filtro grau qualitativo. A limpeza e concentração

foi realizada por extração em fase sólida com coluna de troca iônica forte (SAX, Varian, EUA).

SEPARAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

A determinação da fumonisina B₁ foi realizada segundo método de SHEPHARD et al. (1990) /AOAC Official Method 995.15 (AOAC International, 1997) com modificações segundo CAMARGOS et al. (1999). O método foi desenvolvido e utilizado para milho e produtos derivados. Para a análise de amostras de cerveja como partimos de uma amostra líquida, a amostra teve seu pH corrigido após o que foi filtrada em papel de filtro grau qualitativo. A limpeza e concentração da amostra foram executadas por extração em fase sólida com coluna de troca aniônica forte (SAX, Bond Elut LRC, Varian, EUA) de 10cm³/500mg. A coluna foi primeiramente condicionada com lavagens sucessivas com 10 mL de metanol e 10 mL de metanol/água (3:1). A seguir foram aplicados 50 mL da amostra. A coluna foi então lavada com 10 mL de metanol/água (3:1) seguidos de 6 mL de metanol. A fumonisina B₁ foi eluída com 20 mL de metanol/ácido acético glacial (95:5). O eluato foi evaporado sob fluxo de nitrogênio em banho de água a 60°C. O extrato da amostra foi redissolvido em 500 µL de acetonitrila/água (1:1) e 100 µL destes foram derivados com 200 µL de reagente o-ftaldialdeído – OPA (dissolver 40 mg de o-ftaldialdeído em 1 mL de metanol, diluir com 5 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1M pH 10,4 e adicionar 50 µL de 2-mercaptoetanol) sob agitação em banho de ultra-som a 5 -15°C por 30 segundos. A injeção foi feita após 60 segundos de reação. Foi utilizado um cromatógrafo à líquido Hewlett Packard (HP series 1050, Hewlett Packard, EUA) com bomba isocrática, injetor tipo Rheodyne com alça de injeção de 20 µL, detector de fluorescência HP 1046 (comprimento de onda de excitação 335 nm e de emissão 440 nm) e integrador HP 3393A. As separações foram realizadas em coluna analítica Spherisorb ODS-2 5µm C18 de 250 x 4,6 mm (Supelco, EUA) com fase móvel composta por água/acetonitrila/ácido acético glacial (54:46:1). A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção e a quantificação utilizou padronização externa a partir de injeções do padrão.

CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICO

A cada série de 9 amostras analisadas foi incluído um branco e um teste de recuperação onde uma amostra não contaminada foi adicionada de padrão de fumonisina B₁ de maneira que a amostra ficasse com concentração de 8 ng/mL. Estas amostras foram utilizadas para avaliar a recuperação e os resultados foram corrigidos com a recuperação encontrada em cada série.

Todas as amostras positivas foram analisadas em duplicata. As duplicatas foram analisadas em dias diferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método utilizado para a determinação de fumonisina B₁ com limpeza e concentração da amostra por extração em fase sólida com coluna de troca aniônica forte e separação por cromatografia líquida de alta eficiência demonstrou boa resolução, sem interferências nos cromatogramas (Figuras 1 – 3). O limite de detecção de fumonisina B₁ em amostras de cerveja nas condições de trabalho foi de 0,26 ng/mL. O limite de detecção foi determinado como sendo 3 vezes a média de desvios padrão entre injeções de 8 amostras diferentes com concentração do analito ao redor de 5 ng/mL. O limite de quantificação foi estabelecido como sendo 5 vezes o limite de detecção e nas condições de trabalho foi de 1,3 ng/mL. A recuperação de fumonisina B₁ em amostras de cerveja adicionadas em concentrações entre 5 e 50 ng/mL foi de 98 ± 17% (n = 12) (Tabela 1). Estes valores são comparáveis aos determinados em outros trabalhos. HLYWKA & BULLERMAN (1999) usando colunas de imunoafinidade para extração e limpeza conseguiram um limite de quantificação de 0,3 ng/mL e recuperação de 82 ± 19% (n = 8) com amostras contaminadas artificialmente em concentrações entre 1 a 6 ng de fumonisina B₁ /mL. SCOTT & LAWRENCE (1995) também já haviam conseguido valores similares: limite de detecção para fumonisina B₁ de 0,4 ng/mL e recuperação entre 61 e 114% para amostras com concentração de fumonisina B₁ entre 2 a 10 ng/mL. SCOTT et al. (1997) comparando ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay) e cromatografia líquida para a determinação de fumonisinás em cervejas relataram um limite de detecção igual a 0,2 ng/mL e para concentrações de fumonisina variando de 0,5 a 50 ng/mL uma recuperação de 98,7 a 102,8%

(média = 84,8%) em ensaios conduzidos por ELISA. Para cromatografia líquida, com uso de colunas de imunoafinidade para extração e limpeza relataram limite de detecção igual a 0,1 ng/mL e recuperação de 78,3 a 90,3% (média = 84,0%), usando colunas de imunoafinidade novas e regeneradas a recuperação foi de 63,6 a 95,7% (média = 78,1%) com concentração de fumonisina B₁ igual a 2,5 ng/mL (n = 3). Apesar dos resultados, concluíram que ELISA tem valor considerável apenas em triagem rápida, onde elimina-se o tratamento de amostra. TORRES et al. (1998) usando ELISA conseguiram um limite de detecção para fumonisinas de 3 ng/mL e recuperação média de 81% num nível de contaminação variando entre 0 e 100 ng/mL.

Tabela 1. Recuperação de fumonisina B₁ adicionada a várias concentrações em amostras de cerveja.

Fumonisina B ₁ adicionada (ng/mL)	Recuperação (%)
5	118,3
5	121,2
5	78,0
10	74,7
10	105,9
10	71,6
20	99,0
20	90,1
20	100,6
50	87,5
50	104,8
50	120,4

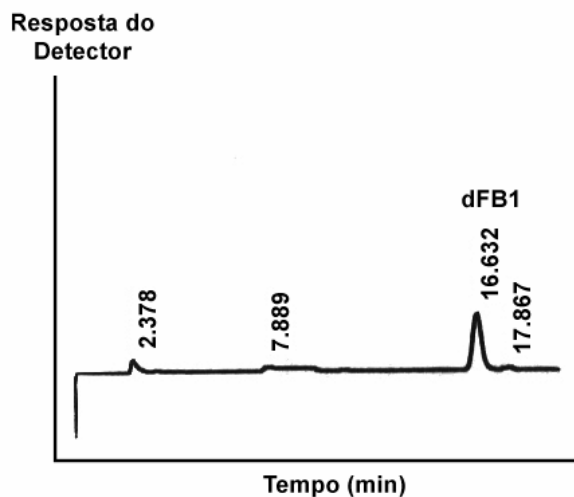


Figura 1. Cromatograma de padrão de Fumonisina B₁ (concentração = 4 ng/mL). Reagente de derivação: o-ftaldialdeído/2-mercaptoetanol. Condições cromatográficas: coluna analítica Spherisorb ODS-2 5µm C18 de 250 x 4,6 mm, fase móvel composta por água:acetonitrila: ácido acético glacial (54:46:1) num fluxo de 1 mL/min e detecção com comprimento de onda de excitação 335 nm e emissão 440 nm.

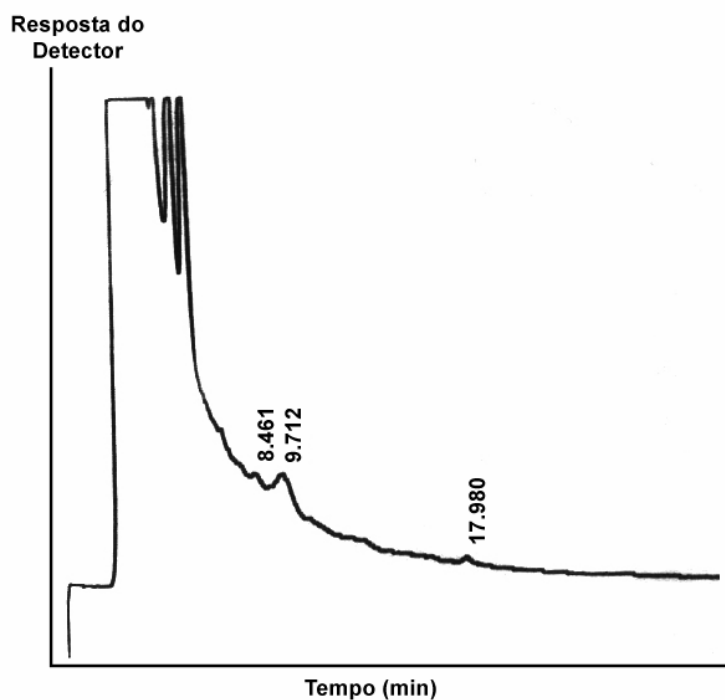


Figura 2. Cromatograma de uma amostra de cerveja não contaminada com Fumonisina B₁. Reagente de derivação: o-ftaldialdeído/2-mercaptoetanol. Condições cromatográficas: coluna analítica Spherisorb ODS-2 5µm C18 de 250 x 4,6 mm, fase móvel composta por água:acetonitrila: ácido acético glacial (54:46:1) num fluxo de 1 mL/min e detecção com comprimento de onda de excitação 335 nm e emissão 440 nm.

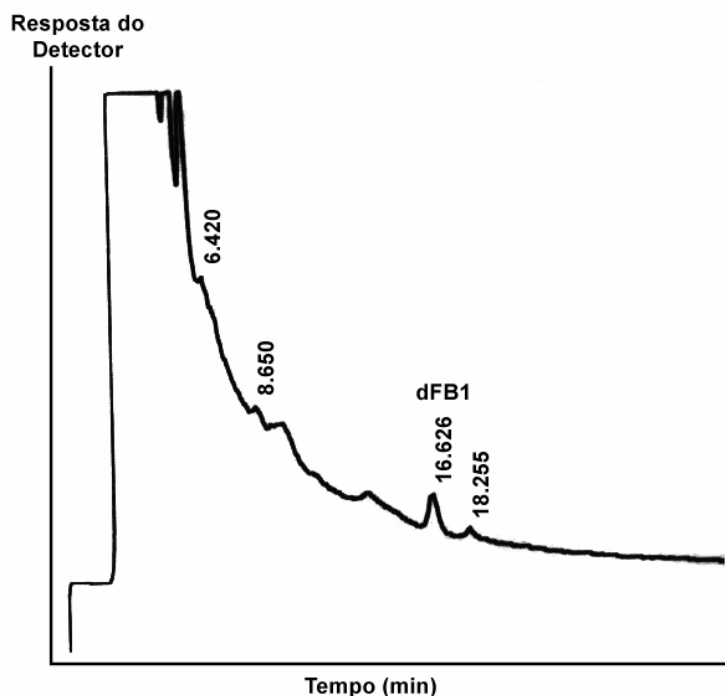


Figura 3. Cromatograma de uma amostra de cerveja contaminada com Fumonisina B₁ (concentração = 14,3 ng/mL). Reagente de derivação: o-ftaldialdeído/2-mercaptoetanol. Condições cromatográficas: coluna analítica Spherisorb ODS-2 5µm C18 de 250 x 4,6 mm, fase móvel composta por água:acetonitrila: ácido acético glacial (54:46:1) num fluxo de 1 mL/min e detecção com comprimento de onda de excitação 335 nm e emissão 440 nm.

Fumonisina B₁ foi detectada em 25 das 58 amostras analisadas (43,1%). O conteúdo de fumonisina B₁ nas amostras positivas variou de 1 a 40 ng/mL (Tabela 2), com uma concentração média de $9,6 \pm 10,2$ ng/mL. Os resultados são superiores aos encontrados por SCOTT & LAWRENCE (1995) em cervejas comercializadas no Canadá, onde apenas 4 das 41 amostras analisadas (10 amostras de cervejas importadas) apresentaram concentração maior que 2 ng/mL. Em outro estudo, SCOTT et al. (1997) analisaram 46 amostras de cervejas comercializadas no Canadá (24 importadas) e encontraram resultados que se assemelham aos nossos em incidência (43,5% das amostras foram positivas para fumonisina B₁) e ordem de grandeza ($5,6 \pm 13,6$ ng/mL). Em ambos os estudos, a origem das amostras contaminadas não foi especificada.

Tabela 2. Ocorrência de fumonisina B₁ nas amostras de cerveja analisadas.

Amostra	Tipo	Estado	Conc. Média e Desvio (ng/mL)*
1	pilsen	SP	4,5±0,3
2	pilsen	SP	15±1
3	escura	SP	14±1
6	pilsen	SP	7,3±0,5
8	pilsen	RJ	14,7±0,2
14	pilsen	PR	2,9±0,3
15	pilsen	PR	39±2
25	pilsen	PB	8±2
27	pilsen	PE	17±1
28	pilsen	RS	11±2
29	pilsen	PB	3,0±0,6
30	pilsen	PB	3,0±0,7
34	pilsen	SP	10,7±0,1
36	pilsen	SE	1,2±0,2
37	pilsen	SP	12±1
38	pilsen	SP	40±4
39	malzbier	SP	2,3±0,3
40	pilsen	SP	2,2±0,4
42	pilsen	SP	10±1
43	pilsen	SP	1,4±0,2
45	pilsen	SP	4±1
46	pilsen	SP	3,0±0,3
51	malzbier	SP	4,3±0,6
54	pilsen	SP	4,3±0,3
56	escura	SP	4,0±0,2

* Os resultados são médias de duplicatas.

Em estudos realizados na Espanha (TORRES et al., 1998) e nos Estados Unidos (HLYWKA & BULLERMAN, 1999) foram observados uma incidência maior que a encontrada no presente estudo. Na pesquisa desenvolvida na Espanha foram coletadas apenas cervejas produzidas no país, 43,8% das cervejas analisadas estavam contaminadas numa faixa de 4,76 ng/mL a 85,53 ng/mL de fumonisina B₁ (média de 28 ± 22 ng/mL) (TORRES et al., 1998). Cervejas comercializadas nos EUA apresentaram uma incidência maior (86% de contaminação) com a somatória de fumonisinas B₁ e B₂ variando de 0,3 ng/mL a 13,5 ng/mL e uma concentração média de 4,0 ± 3,4 ng/mL nas amostras contaminadas. Do total de 29 amostras, 25 eram americanas e 21 apresentaram quantidades detectáveis de fumonisinas. Todas as 3 amostras de cervejas mexicanas tiveram concentração < 1 ng/mL enquanto que a única amostra canadense analisada apresentou 9 ng/mL para a somatória de fumonisinas B₁ e B₂ (HLYWKA & BULLERMAN, 1999).

O consumo per capita de cerveja no Brasil em 2001 foi de 50,3 L/ano (SINDICERV, 2002), que ainda é baixo se comparado aos países maiores consumidores de cerveja como a Alemanha, onde em 1991 homens adultos consumiram 516 mL/dia (MÜLLER et al., 1998). Considerando o consumo per capita de cerveja no Brasil igual a 50,3 L/ano (SINDICERV, 2002) e a ingestão diária máxima tolerável provisória de 2000 ng de fumonisina B₁ por Kg de peso corpóreo (JECFA, 2001), vemos que a ingestão de cerveja não apresenta risco até onde conhecemos atualmente, mesmo para grandes consumidores (650 a 1300 mL/dia – considerando 5 a 10 vezes o consumo per capita). Assumindo um conteúdo de fumonisina igual a 10ng/mL, estes consumidores exagerados iriam ingerir 6,5 a 13 µg de fumonisina. Considerando um adulto de 70 Kg, a ingestão diária seria de 93 a 186 ng/Kg p.c., valores bem abaixo da ingestão diária máxima tolerável provisória de 2000 ng de fumonisina B₁ por Kg de peso corpóreo (JECFA, 2001). Porém, nestes cálculos consideramos apenas a contribuição da cerveja na dieta e fica evidente que a adoção de um sistema de controle da matéria-prima nas cervejarias seria interessante, já que a contaminação de cereais por micotoxinas pode ser bastante variável. Evitar-se-ia assim a possível

contaminação do produto final e haveria uma melhoria de qualidade no produto, eliminando-se este risco adicional.

CONCLUSÃO

O levantamento realizado para detectar a presença de fumonisina B₁ em cerveja nacional demonstrou que a contaminação nas amostras deste estudo não é um problema mesmo para grandes consumidores (650 a 1300 mL/dia).

Apesar da baixa contaminação verificada, a adoção de um sistema de controle da matéria-prima nas cervejarias seria interessante, já que a contaminação pode variar a cada safra e assim tal procedimento asseguraria um produto de melhor qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, J.F.; GELDERBLOM, W.C.A.; THIEL, P.G.; VAN SCHALKWYK, D.; BEHREND, Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, 56, 1729-1733, 1990.
- AOAC International. Association of Official Analytical Chemists International. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Edited by CUNNIFF, P. 16th ed., 3rd rev., 1997.
- BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L.; PLATTNER, R.D.; ECKHOFF, S.A. Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn. In: JACKSON, L.S.; DEVRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B. (eds.) Fumonisins in Food, (**Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.392), p.317-322, 1996.
- BULLERMAN, L.B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: JACKSON, L.S.; DEVRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B. (eds.) **Fumonisins in food**. Plenum Press, p.27-38, 1996.

- BULLERMAN, L.B. & TSAI, W.J. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, 57(6), 541-546, 1994.
- CAMARGOS, S.M.; MACHINSKI JR, M.; VALENTE SOARES, L.M. Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 58(2), 71-79, 1999.
- CHELKOWSKI, J. & LEW, H. *Fusarium* species of Liseola section occurrence in cereals and ability to produce fumonisins. **Microbiologie Aliments Nutrition**, 10, 49-53, 1992.
- DOKO, M.B. & VISCONTI, A. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, 11(4), 433-439, 1994.
- HENNIGEN, M.R.; SANCHEZ, S.; DI BENEDETTO, N.M.; LONGHI, A.; TORROBA, J.E.; SOARES, L.M.V. Fumonisin levels in commercial corn products in Buenos Aires, Argentina. **Food Additives and Contaminants**, 17(1), 55-58, 2000a.
- HENNIGEN, M.R.; VALENTE SOARES, L.M.; SANCHEZ, S.; DI BENEDETTO, N.M.; LONGHI, A.; EYHÉRABIDE, G.; TORROBA, J.E.; ZANELLI, M. Fumonisin in corn hybrids Grown in Argentina for two consecutive seasons. In: DE KOE, W.J.; SAMSON, R.A.; VAN EGMOND, H.P.; GILBERT, J.; SABINO, M. (eds.) **Proceedings of the Xth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins** – 21-25 May, Chap. 9, 331-339, 2000b.
- HLYWKA, J.J. & BULLERMAN, L.B. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in beer. **Food Additives and Contaminants**, 16(8), 319-324, 1999.
- JACKSON, L.S.; HLYWKA, J.J.; SENTHIL, K.R.; BULLERMAN, L.B.; MUSSER, S.M. Effects of time, temperature and pH on the stability of fumonisins B₁ in an aqueous model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, 906-912, 1996a.
- JACKSON, L.S.; HLYWKA, J.J.; SENTHIL, K.R.; BULLERMAN, L.B. Effects of thermal processing on the stability of fumonisins B₂ in an aqueous model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, 1984-1987, 1996b.

- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: World Health Organization; Fifty-sixth meeting, 2001.
- MACHINSKI JR, M. & SOARES, L.M.V. Fumonisin B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, 17(10), 875-879, 2000.
- MÜLLER, M.; ANKE, M.; ILLING-GÜNTHER, H.; THIEL, C. Oral cadmium exposure of adults in Germany. 2. Market basket calculations. **Food Additives and Contaminants**, 15, 135-141, 1998.
- PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M.; GLEADLE, A.E. Surveillance of fumonisins in U.K. maize based foods and other cereals. **Food Additives and Contaminants**, 40, 1352-1354, 1997.
- SCOTT, P.M. & LAWRENCE, G.A. Analysis of beer for fumonisins. **Journal of Food Protection**, 58(12), 1379-1382, 1995.
- SCOTT, P.M.; KANHERE, S.R.; LAWRENCE, G.A.; DALEY, E.F.; FARBER, J.M. Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B₁ and B₂. **Food Additives and Contaminants**, 12, 31-40, 1995.
- SCOTT, P.M.; YEUNG, J.M.; LAWRENCE, G.A.; PRELUSKY, D.B. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of beer for fumonisins. **Food Additives and Contaminants**, 14, 445-450, 1997.
- SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, 13, 2077-2087, 1990.
- SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 79(3), 671-687, 1996.
- SINDICERV, Sindicato Nacional de Indústrias da Cerveja. Mercado. In: <http://www.sindicerv.com.br>, em 12/11/2002.
- SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; STOCKENSTRÖM, S. Fumonisin contamination of commercial corn-based

- human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39, 2014-2018, 1991.
- TORRES, M.R.; SANCHIS, V; RAMOS, A.J. Occurrence of fumonisins in Spanish beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. International **Journal of Food Microbiology**, 39, 139-143, 1998.
- VISCONTI, A. & DOKO, M.B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 77(2), 546-550, 1994.

CONCLUSÕES GERAIS

As informações geradas no presente trabalho permitem avaliar dentre os produtos analisados quais apresentam maior risco quanto a presença de micotoxinas assim como ampliam a percepção da magnitude da contaminação de alimentos por micotoxinas em nosso país.

A verificação e aquisição de dados de co-ocorrência de micotoxinas devem ser incentivadas para que se possa ter uma estimativa mais realista da exposição da nossa população a estes contaminantes e permita uma futura discussão sobre uma legislação adequada para o controle da contaminação de alimentos e rações pelas micotoxinas de mais frequentemente encontradas e em teor mais elevado. O método desenvolvido para determinação de patulina e verruculogeno em polpas de tomate pode ser empregado em um levantamento em polpas de tomate embaladas assepticamente em lotes de duas safras produzidos por indústrias localizada no Estado de São Paulo e no Estado de Goiás. O levantamento indicou que estas toxinas não são comumente encontradas neste tipo de produto.

A avaliação de produtos a base de milho comercializados na cidade de Recife, por três anos, para a presença de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona mostrou que fumonisina B₁ é um contaminante freqüente nestes produtos atingindo 94,6% das amostras examinadas. Estes resultados não recomendam o uso freqüente de produtos de milho pela população, principalmente por crianças. Aflatoxinas aparentam ser um contaminante esporádico e que aparece em baixos níveis. Ocratoxina A e zearalenona não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas.

O levantamento realizado em cervejas nacionais provenientes de nove Estados brasileiros indicou que fumonisina B₁ aparece com alta freqüência neste tipo de bebida (43,1%), porém em níveis baixos. A adoção de um sistema de controle da matéria-prima nas cervejarias, no entanto, é recomendável devido à conhecida sazonalidade da contaminação de alimentos por micotoxinas.