

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO E
INCIDÊNCIA DE AFLATOXINA M₁, PATULINA E ACIDO
CICLOPIAZÔNICO EM ALGUNS ALIMENTOS BRASILEIROS

Para
Este exemplar corresponde a edição final da Tese defendida
por Célia Maria de Syllos e aprovada pela Comissão Julgadora
em 28.02.94.

Délia R. 4

CÉLIA MARIA DE SYLOS *nº 54 / tc CM000344409*
ENGENHEIRA DE ALIMENTOS
MESTRE EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Dra. DÉLIA RODRIGUEZ-AMAYA
ORIENTADORA

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

Campinas, SP - 1994



BANCA EXAMINADORA

Delia R. Amaya

Profa. Dra. Delia Rodriguez-Amaya
(Orientadora)

Benedito Corrêa

Prof. Dr. Benedito Corrêa
(membro)

Carol H. Collins

Profa. Dra. Carol H. Collins
(membro)

Suplente

Profa. Dra. Hilary C. de Menezes
(membro)

Suplente

Prof. Dr. João Bosco Faria
(membro)

João Shojiro Tango

PROF. Dr. João Shojiro Tango
(membro)

Myrna Sabino

Dra. Myrna Sabino
(membro)

AGRADECIMENTOS

À Dra. Délia Rodriguez-Amaya pela orientação e apoio dedicados a esse trabalho, e pelo exemplo de pessoa e profissional.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, pela permissão de afastamento para frequência em curso de Pós-Graduação.

Ao CNPq e a FINEP pelo apoio financeiro.

À CAPES pela concessão de bolsa durante parte do período de execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões na redação final do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, pelo carinho e amizade.

À todos que me apoiaram e incentivaram e que de uma forma ou de outra, deram seu auxílio para a realização da pesquisa.

ÍNDICE

	página
ÍNDICE DE TABELAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 - AFLATOXINA M ₁	3
2.1.1 - Considerações Gerais	3
2.1.2 - Ocorrência em Alimentos	6
2.1.3 - Métodos Analíticos	9
2.1.3.1 - Extração	10

2.1.3.2 - Limpeza	13
2.1.3.3 - Quantificação	14
2.1.3.4 - Confirmação	17
2.2 - PATULINA	19
2.2.1 - Considerações Gerais	19
2.2.2 - Ocorrência em Alimentos	22
2.2.3 - Métodos Analíticos	26
2.3 - ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO	30
2.3.1 - Considerações Gerais	30
2.3.2 - Ocorrência em Alimentos	32
2.3.3 - Métodos Analíticos	35
 3 - MATERIAL E MÉTODOS	 39
3.1- AMOSTRAGEM	39
3.2 - PREPARO DE AMOSTRAS ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS.	40
3.2.1 - Aflatoxina M ₁	40
3.2.2 - Patulina	41
3.2.3 - Ácido Ciclopiazônico	41
3.3 - DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M ₁	41
3.3.1 - Avaliação da Extração e Limpeza	41

3.3.2 - Cromatografia em Camada Delgada	49
3.3.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	50
3.4 - DETERMINAÇÃO DE PATULINA	54
3.5 - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO	61
3.6 - DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS	65
 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	 67
4.1 - AFLATOXINA M ₁	67
4.1.1 - Estabelecimento do Método	67
4.1.2 - Incidência em Leite e Derivados	78
4.2 - PATULINA	84
4.2.1 - Estabelecimento do Método	84
4.2.2 - Incidência em Sucos e Frutas	97
4.3 - ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO	99
4.3.1 - Estabelecimento do Método	99
4.3.2 - Incidência em Amendoim e Milho	101
 5 - CONCLUSÕES	 110
 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 112

ÍNDICE DE TABELAS

página

TABELA 1- Incidência de aflatoxina M_1 em leite e derivados	7
TABELA 2- Procedimentos de extração e limpeza para aflatoxina M_1	11
TABELA 3- Procedimentos para quantificação e confirmação para aflatoxina M_1	15
TABELA 4- Incidência de patulina em frutas e sucos	23
TABELA 5- Procedimentos de extração, limpeza e quantificação para patulina	27
TABELA 6- Incidência de ácido ciclopiazônico em alimentos	33
TABELA 7- Procedimentos de extração, limpeza e quantificação para ácido ciclopiazônico	36
TABELA 8- Esquema da avaliação da extração e limpeza ...	42
TABELA 9- Características dos extratos obtidos das etapas de extração e limpeza para AFM_1	68

TABELA 10- Porcentagens de recuperação obtidas da reutilização da coluna de C_{18}	71
TABELA 11- Recuperação de AFM_1 adicionada na coluna	76
TABELA 12- Recuperação de AFM_1 no método completo	77
TABELA 13- Incidência de aflatoxina M_1 em leite e derivados	79
TABELA 14- Teores de aflatoxina M_1 nas amostras positivas de leite pasteurizado	81
TABELA 15- Porcentagens de recuperação de AFM_1 em leite pelo método por CLAE	83
TABELA 16- Porcentagens de recuperação da patulina adicionada ao suco de maçã obtidas pelos três métodos avaliados	90
TABELA 17- Recuperação da patulina adicionada ao suco de maçã pelo método de MOLLER & JOSEFSSON (1980) ..	91
TABELA 18- Incidência de patulina em sucos de frutas	98
TABELA 19- Teores de patulina em amostras de maçã deteriorada	100
TABELA 20- Recuperação de ácido ciclopiazônico adicionado ao amendoim pelo método de URANNO <i>et alii</i>	103

TABELA 21- Incidência de ácido ciclopiazônico e aflatoxinas	
em produtos de amendoim e milho	108
TABELA 22- Incidência de ácido ciclopiazônico e aflatoxinas	
nas amostras positivas	109

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
FIGURA 1- Estruturas das aflatoxinas B_1 e M_1	4
FIGURA 2- Reação de derivação da AFM_1 com ácido trifluoroacético	18
FIGURA 3- Estrutura da patulina	19
FIGURA 4- Estrutura do ácido ciclopiazônico	30
FIGURA 5- Esquema para determinação de AFM_1 pelo proc. 974.17 (AOAC, 1990)	46
FIGURA 6- Esquema para determinação de AFM_1 pelo proc. 980.21 (AOAC, 1990)	47
FIGURA 7- Esquema para extração de AFM_1 com Sep-Pak de C_{18} , proc. 986.16 (AOAC, 1990)	51
FIGURA 8- Curva de calibração característica para aflatoxina M_1	53
FIGURA 9- Esquema para determinação de patulina, segundo o proc 974.18 da AOAC modificado (1990)	55
FIGURA 10- Esquema para determinação de patulina, segundo o procedimento de SIRIWARDANA & LAFONT modifica-	

do (1979b)	56
FIGURA 11- Esquema para determinação de patulina, segundo o método de MOLLER & JOSEFSSON (1980)	57
FIGURA 12- Curva padrão característica para patulina	60
FIGURA 13- Esquema para determinação de ácido ciclopiazônico, segundo o método de URANO <i>et alii</i> (1992a) ..	62
FIGURA 14- Curva padrão característica para ácido ciclopiazônico	64
FIGURA 15- Aspecto do cromatograma (em placa de sílica) dos extratos provenientes de amostras de leite obtido pelo proc. 980.21 (AOAC, 1990). Fases mó- veis testadas: clorofórmio-acetona-metanol (90:10:2) (A); clorofórmio-acetona (9:1) (B); clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3) (C); éter etílico-metanol-água (95:4:1) (D); tolueno- acetato de etila-ácido fórmico (6:3:1) (E); mul- tidesenvolvimento (C, depois D) (F). Aflatoxina M ₁ representada pela mancha sólida	73

FIGURA 16- Cromatograma obtido de amostra de queijo por CCD-bidimensional desenvolvido com clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3) (I) e éter etílico-metanol-água (95:4:1) (II). Aflatoxina M₁ representada pela mancha sólida 68

FIGURA 17- Cromatogramas característicos de um padrão de AFM₁ derivado com TFA (A); de uma amostra de leite contaminada derivada com TFA (B) e de uma amostra de leite não contaminada derivada com TFA (C). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 um, (100 x 4,6 mm) ; fase móvel: água-isopropanol-acetonitrila (80:12:8); vazão de 0,5 mL/min; detector por fluorescência: excitação a 365 nm e emissão a 410 nm 82

FIGURA 18- Cromatograma obtido pelo metodo da AOAC (199). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 um, (150x4,6mm); fase móvel THF 3% aquoso vazão de 1,0 mL/ min; detector por arranjo de diodos a 278 nm 85

- FIGURA 19- Cromatograma obtido pelo método da AOAC modificado (1990). Condições cromatográficas: coluna spherisorb ODS-1, 5 um, (150x4,6mm); fase móvel THF 3% aquoso; vazão de 1,0 mL/min; detector por arranjo de diodos a 278 nm 87
- FIGURA 20- Cromatograma obtido pelo método de SIRIWARDANA & LAFONT. Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 um, (150x4,6mm); fase móvel THF 3% aquoso; vazão de 1,0 mL/min; detector por arranjo de diodos a 278 nm 88
- FIGURA 21- Cromatograma obtido pelo método de MOLLER & JOSEFSON. Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 um, (150x4,6mm); fase móvel THF 3% aquoso; vazão de 1,0 mL/min; detector por arranjo de diodos a 278 nm 89
- FIGURA 22- Cromatogramas característicos de um padrão de patulina (A) e de um suco de maçã não contaminado (B). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5um , (150x4,6mm); fase móvel: água destilada ; vazão de 1,2 mL/min; detector por ar-

ranjo de diodos a 278 nm 93

FIGURA 23- Cromatogramas característicos de um suco de maçã contaminado (A) e de uma amostra de maçã deteriorada (B). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5µm, (150x4,6mm); fase móvel: água destilada; vazão de 1,2 mL/ min; detector por arranjo de diodos a 278 nm 94

FIGURA 24- Confirmação e teste de pureza - espectros de absorção característicos de padrão de patulina (A), de amostra de suco de maçã contaminada (B) e de maçã estragada (C) obtido pelo detector por arranjo de diodos, para os dois últimos no início (1), máximo (2) e fim (3) do pico 95

FIGURA 25- Cromatogramas característicos de uma amostra não acetilada de suco de maçã contaminado (A) e de uma amostra acetilada de suco de maçã contaminado. Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5µm , (150 x 4,6mm); fase móvel água destilada; vazão de 1,2 mL/ min; detector por arranjo de diodos a 278 nm 96

FIGURA 26- Confirmação e teste de pureza - espectros de absorbância característicos de padrão de ácido ciclopiazônico (A) e de uma amostra de amendoim contaminado (B) obtidos pelo detector por arranjo de diodos, para o último no início (1), máximo (2) e no fim (3) do pico 102

FIGURA 27- Cromatogramas característicos de um padrão de ácido ciclopiazônico (A) e de uma amostra de amendoim contaminado (B). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1 , 5 um, (150 X 4,6 mm); fase móvel gradiente linear de 0-4mM de sulfato de zinco em metanol 85%; vazão de 1,5 mL/min; detector por arranjo de diodos a 282 nm 104

FIGURA 28- Cromatogramas característicos de uma amostra de milho artificialmente contaminada (A) e de uma amostra de milho não contaminado (B). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 um, (150 X 4,6 mm); fase móvel gradiente linear de 0-4mM de sulfato de zinco em metanol 85%; vazão

de 1,5 mL/min; detector por arranjo de diodos
a 282 nm 105

FIGURA 29- Cromatograma de uma amostra de amendoim artificialmente contaminado com ácido ciclopiazônico obtido pelo método de URANO *et alli* sem a etapa de limpeza. Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 um , (150 X 4,6 mm) ; fase móvel gradiente linear de 0-4 mM de sulfato de zinco em metanol 85%; vazão de 1,5 mL/min; detector por arranjo de diodos a 282 nm 106

RESUMO

Avaliou-se os métodos analíticos e a incidência de aflatoxina M_1 , patulina e ácido ciclopiazônico em produtos alimentícios comercializados na cidade de Campinas.

Várias tentativas foram realizadas para a escolha do solvente extratante e da melhor técnica para remover os interferentes das amostras de leite e derivados para determinação de aflatoxina M_1 . Na extração foram utilizados acetona, metanol e clorofórmio puros, misturados entre si ou com água. Precipitação com sais de metais pesados, partição entre solventes imiscíveis e colunas cromatográficas foram avaliados para promover a limpeza do extrato. A utilização de metais pesados não foi eficiente para eliminar os interferentes. O uso conjunto de clorofórmio e uma coluna cromatográfica demonstrou ser a maneira mais eficiente de extrair a aflatoxina M_1 e remover substâncias interferentes. Colunas cromatográficas de sílica e sílica- C_{18} apresentaram melhores resultados que a coluna de celulose. A cromatografia líquida de alta eficiência dos derivados com ácido trifluoroacético e detecção por fluorescência apresentou sensibilidade e especificidade bem maior que o método por cromatografia em camada delgada com quantificação visual da intensidade de fluorescência para determinação de aflatoxina M_1 .

Duzentas e quatro amostras de leite pasteurizado (103), leite em pó (35), queijos (36) e iogurte (30) coletadas durante os anos de 1989/90 e de 1992 foram analisadas. A aflatoxina M_1 foi encontrada em apenas quatro amostras de leite pasteurizado com níveis de 73 a 370 ng/L em 1992, ano em que as análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Três métodos foram avaliados para a determinação de patulina: os da AOAC (1990), de SIRIWARDANA & LAFONT (1979b) e de MOLLER & JOSEFSSON (1980). A quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, inclusive para os dois primeiros métodos nos quais a técnica especificada era cromatografia em camada delgada. O método de MOLLER & JOSEFSSON foi o que apresentou melhores porcentagens de recuperação e um extrato mais limpo, resultando um cromatograma cujo pico da patulina apareceu livre de interferentes.

Sessenta e cinco amostras de sucos de frutas (maçã (20), uva (17), abacaxi (10), goiaba (6), manga (6), mamão (3) e banana (3)) e 24 amostras de frutas (maçã (15), mamão (6) e manga (3)) foram analisadas e apenas uma de suco de maçã estava contaminada por patulina com 17 ug/L. Seis amostras de maçã deteriorada foram também analisadas e todas continham patulina em níveis que variaram de 150 a 340 ug/ kg.

Foi investigada também a ocorrência simultânea de ácido ciclopiazônico e aflatoxinas B e G em amostras de amendoim, milho e seus derivados, utilizando o método de URANO *et alii* (1992a) e de SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989), respectivamente. Em 28 amostras de amendoim e derivados, a presença de ácido ciclopiazônico foi constatada em 4 amostras de amendoim cru, com níveis de 150 a 369 ug/kg. As aflatoxinas foram encontradas em 11 amostras de amendoim cru, amendoim torrado salgado e paçoca com teores de 8 a 340 ug/kg (aflatoxinas totais). As duas toxinas ocorreram simultaneamente em três amostras de amendoim cru. Tanto ácido ciclopiazônico como as aflatoxinas não foram detectados em 25 amostras de milho e derivados (milho de pipoca, farinha de milho e fubá).

Os resultados demonstram que a contaminação de leite e derivados por aflatoxina M₁ e de frutas e sucos de frutas por patulina não constitui um problema de saúde pública na cidade de Campinas. Por outro lado, a ocorrência de ácido ciclopiazônico agrava ainda mais a situação do amendoim e seus derivados que são largamente contaminados por aflatoxinas B e G. Estas duas também não são problemáticas em milho e derivados.

SUMMARY

In Brazil there is a paucity of information in relation to the mycotoxins aflatoxin M₁, patulin and cyclopiazonic acid. Thus, these mycotoxins were investigated in terms of the analytical methods used for their determination and of their incidence in food products commercialized in Campinas.

Various trials were carried out to choose the extracting solvent and the best technique for removing interfering substances from samples of milk and dairy products for the determination of aflatoxin M₁. For extraction acetone, methanol and chloroform were utilized either singly, in combination with each other or with water. Precipitation with heavy metal salts, partition between immiscible solvents and conventional column chromatography were evaluated for clean-up. Heavy metals by themselves were not effective in eliminating interfering substances. The combined use of chloroform and a chromatographic column proved to be the most efficient procedure for extraction and clean-up. Columns packed with silica or silica-C₁₈ gave better results than those of cellulose. High performance liquid chromatography of trifluoroacetic acid derivatives and using fluorescence detection, presented much higher sensitivity and specificity than thin layer chromatography with visual quantification of the fluorescence intensity for aflatoxin M₁ determination.

Two hundred and four samples of milk (103), powdered milk (35), cheese (36) and yoghurt (30), collected in 1989/90 and in 1992, were analyzed. Aflatoxin M₁ was found in only 4 samples of

milk at 73 to 370 ng/L in 1992, the year when the analyses were carried out by high performance liquid chromatography.

Three methods for the determination of patulin were evaluated: those of the AOAC (1990), SIRIWARDANA & LAFONT (1979b) and MOLLER & JOSEFSSON (1980). Quantification was performed by high performance liquid chromatography, even for the first two methods where thin layer chromatography was the specified technique. The method of MOLLER & JOSEFSSON presented higher recovery percentages and resulted in a clean extract, giving chromatograms with the patulin peak free of interferences.

Sixty-five samples of fruit juices (apple (20), grape (17), pineapple (10), guava (6), mango (6), papaya (3) and banana (3)) and 24 samples of fruits (apple (15), papaya (6) and mango (3)) were analyzed and only one sample of apple juice had patulin at 17 ug/L. Six samples of spoiled apple were also submitted to analysis, all of which were contaminated with patulin at 150 to 340 ug/ kg.

The co-occurrence of cyclopiazonic acid and aflatoxins B and G in peanuts, corn and their products was also investigated, using the methods of URANO *et alii* (1992) and SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989), respectively. Of 28 samples of peanuts and peanut products, cyclopiazonic acid was encountered in 4 samples of raw peanuts at 150 to 369 ug/ kg. Aflatoxins were found in 11 samples of raw peanuts, roasted salted peanuts and ground peanut bar at 8 to 340 ug/kg (total aflatoxins). The two toxins co-existed in 3 samples. Cyclopiazonic acid and aflatoxins were not detected in 25 samples of corn (popcorn, corn flour and grits).

The results show that contamination of milk and dairy products with aflatoxin M₁ and of fruits and fruit juices with patulin does not constitute a public health problem in the city

of Campinas. On the other hand, the occurrence of cyclopiazonic acid can aggravate the situation of peanuts and peanut products, already shown to be highly contaminated with aflatoxins B and G. These two toxins are not problematic in corn and corn products.

1- INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários de várias espécies de fungos que podem causar efeitos tóxicos em homens e animais.

Os diferentes fungos produtores de micotoxinas são encontrados em todas as regiões do mundo e podem crescer em uma grande variedade de substratos e sob várias condições de umidade, pH e temperatura. Assim, os alimentos estão sujeitos à invasão por fungos e contaminação com micotoxinas no campo, durante e após a colheita, no processamento, no transporte e na estocagem, quando não são empregadas técnicas adequadas de manuseio.

As investigações sobre incidência de micotoxinas em alimentos e rações é de suma importância para que esforços possam ser concentrados na prevenção, no controle da contaminação ou na destoxificação dos produtos susceptíveis a esse tipo de contaminação. Neste sentido e com vistas a garantir a confiabilidade dos resultados, relativos à incidência de micotoxinas em alimentos, estudos visando aprimorar a metodologia para sua detecção e quantificação são sem dúvida urgentes e necessários.

No presente trabalho, foram estudadas três micotoxinas para as quais ainda existem uma lacuna de informações no país, tanto em relação à metodologia quanto à sua incidência.

O conhecimento da incidência e dos níveis de aflatoxina M_1 em leite e seus derivados, produtos consumidos pela população infantil, não podem ser adiados, pois estudos de toxicidade com animais tem mostrado que a sensibilidade às aflatoxinas é maior em jovens.

A patulina pode ser encontrada em frutas, e principalmente na maçã. No Brasil, a produção de maçã tem aumentado nos últimos anos, o que tem possibilitado a sua industrialização na forma de suco. Como a referida toxina é destruída apenas parcialmente pelo processamento, a sua presença nos sucos pode ser um índice da qualidade da matéria prima utilizada. A ocorrência ou não desta toxina em outras frutas brasileiras não foi ainda investigada.

Outra micotoxina cuja incidência tem causado preocupação em todo mundo e ainda não tem sido estudada no Brasil é o ácido ciclopiazônico, que a exemplo de aflatoxinas B e G, é produzido pelo *Aspergillus flavus* e que pode coexistir com as aflatoxinas.

O presente trabalho tem por objetivos avaliar as metodologias analíticas e verificar a incidência de aflatoxina M₁ em leite e derivados, de patulina em frutas e sucos de frutas e de ácido ciclopiazônico em amendoim e milho.

2- REVISÃO BIBLIOGRAFICA

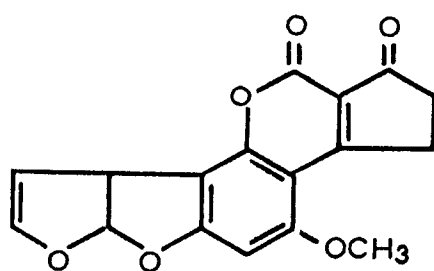
2.1- AFLATOXINA M₁

2.1.1- Considerações Gerais

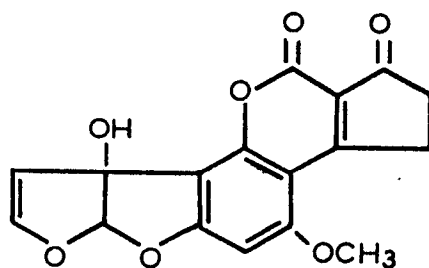
Dentre as micotoxinas existentes, as aflatoxinas, produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxidez e ampla ocorrência, possuindo inclusive propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas. As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ são as mais estudadas, já existindo metodologia definida para uma série de produtos agrícolas. Numerosos levantamentos sobre sua ocorrência em alimentos e rações também já foram realizados.

Quando o gado leiteiro é alimentado com ração contaminada com aflatoxina B₁, parte desta pode ser convertida em um derivado 4-monoidroxilado, a aflatoxina M₁ (AFM₁) (FIGURA 1), a qual é excretada no leite.

ALLCROFT & CARNAGHAN (1963), PURCHASE (1967) e BULLERMAN (1979) verificaram que a toxidez da AFM₁ em patinhos e ratos aproximava-se da de aflatoxina B₁. O seu efeito carcinogênico ainda é controvertido. SINNHUBER et alii (1970) observaram o crescimento de tumores similares àqueles produzidos pela aflatoxina B₁ em trutas alimentadas com aflatoxina M₁. Por outro lado, BARNES (1970) não observou a formação de tumores no fígado de ratos que foram alimentados com AFM₁. Em experimentos com



AFB₁.



AFM₁.

FIGURA 1 - Estruturas das Aflatoxinas B₁ e M₁.

ratos machos, a AFM₁ mostrou menor potencial carcinogênico que AFB₁ (CULLEN *et alii*, 1988).

Estudos realizados para determinar a relação entre a ingestão de aflatoxinas e a excreção de AFM₁ no leite demonstraram uma conversão média de 1,5% (NABNEY & BURBAGE, 1967; MARSI *et alii*, 1969 ; POLAN *et alii*, 1974 ; PRICE *et alii*, 1985; FROBISH *et alii*, 1986).

McKINNEY *et alii* (1973) relataram que o conteúdo de AFM₁ diminuía com o tempo de estocagem do leite naturalmente contaminado. Aproximadamente 40% do teor decrescia após 4 dias de estocagem a 0 °C. Já STOLOFF *et alii* (1975), usando leite artificialmente contaminado, verificaram que o teor de AFM₁ ficou estável durante 17 dias à 4 °C. BLANCO *et alii* (1988a) também observaram que o conteúdo de AFM₁ não se alterou durante o armazenamento de queijos a 4 °C por 60 dias e a -18 °C por 90 dias.

Uma vez que a AFM₁ pode estar presente no leite in natura, alguns pesquisadores estudaram o efeito da pasteurização no leite contaminado. PURCHASE *et alii* (1972) registraram reduções no teor de AFM₁ de 33 a 45% para leite pasteurizado a 62 °C por 30 min e a 72 °C por 45 seg, respectivamente. No entanto, STOLOFF *et alii* (1975) e WISEMAN *et alii* (1983) não constataram reduções em leite pasteurizado a 65 °C por 30 min ou a 77 °C por 45 seg.

Na fabricação de queijo "cottage", a partir de leite contaminado, foram observadas diminuições nos teores de AFM₁ que variaram de 20 a 65% (PURCHASE *et alii*, 1972 ; McKINNEY *et alii*, 1973 ; STUBBLEFIELD & SHANNON, 1974a ; STOLOFF *et alii*, 1975). BLANCO *et alii* (1988a) verificaram perdas de aproximadamente 10% do teor inicial de AFM₁ do leite contaminado (2137 ng/ L) na elaboração de queijo "manchego".

A Legislação Brasileira em vigor não faz qualquer referência quanto a limites de tolerância de aflatoxina M_1 em leite e derivados. Existe a proposta do Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas de permitir até 500 ng/kg ou L de aflatoxina M_1 em leite e derivados, limite igual aos permitidos nos Estados Unidos. Alguns países, como a Suíça, possuem legislações mais severas e detalhadas que estabelecem 50 ng/L como limite máximo de tolerância para leite, 10 ng/kg para leite em pó destinados à bebês e 250 ng/kg para queijos. Na Holanda o limite permitido é de 100 ng/L e outros países europeus já estão estudando medidas semelhantes (EGMOND, 1989).

2.1.2- Ocorrência em Alimentos

Pesquisas efetuadas em vários países tem mostrado níveis significativos de contaminação. A situação tem melhorado nos últimos anos devido a adoção de medidas que visam a limitação da ingestão de rações contaminadas com aflatoxina B_1 pelas vacas lactantes (PIVA *et alii*, 1987).

Na TABELA 1 estão apresentados alguns levantamentos sobre a incidência de AFM_1 realizados em vários países.

Na Alemanha, em 1972, KIERMEIER (1973) analisou 61 amostras de leite cru, encontrando 28 (46%) contaminadas com teores de AFM_1 de 40 a 250 ng/ L.

Num estudo, realizado em 1977, com 302 amostras de leite americano, constatou-se que 63% estavam contaminadas com níveis de até 700 ng/ L (STOLOFF, 1980).

TABELA 1 - Incidência de aflatoxina M₁ em leite e derivados.

País de origem da amostras	Ano	No. de amostras analisadas	Produto	% Contaminação	Faixa (ng/kg ou L)	Referência
Alemanha	1972	61	leite cru	46	40-250	KIERMEIER (1973)
	1987	225	leite	14	< 23	PIVA et alii(1987)
	1987	34	queijo	26		
Estados Unidos	1977	302	leite	63	< 700	STOLOFF (1980)
	1983	4	leite em pó	100	400-1050	CHANG & DEVRIES (1983)
França	1980/81	380	leite	44	80-1150	BLANC & KARLESKIND(1981)
		222	leite em pó	58	690-5200	
		343	queijo	30	95-2150	
		101	prod. lacteo	32	115-4750	
	1981	160	leite	0	ND	MAFFEO & LEARI(1981)
	1983	50	queijo	8	> 50- 100	FINOLLI et alii(1983)
	1983	233	leite em pó	25	2- 8 ^a	RIBBERZANI et alii(1983)
	1983	34	queijo	51	20- 500	
	1987	880	leite	13	< 23	PIVA et alii(1987)
	1987	82	queijo	20	< 23	
Reino Unido	1981/83	409	leite	6	> 10	GILBERT et alii(1984)
	1981/83	277	leite em pó	2	> 30	
Brasil	1981	10	leite	30	25- 0	DELLA ROSA & MORAES(1981)
	1989	100	leite	1	220	SABINO et alii(1989)
	1989	50	leite cru	42	100-1680	
Espanha	1983	95	leite	7	20-40	BURDASPALL et alii(1983)
	1988	47	leite	30	20-100	BLANCO et alii(1988b)
Japão	1983	13	leite	0	-	TAKEDA(1984)
Itália	1985	52	leite cru	51	5-146	BOCCIA et alii(1985)
	1985	18	leite	67	5-30	
	1985	106	leite	72	4-280	VISCONTI et alii(1985)
	1987	276	leite	25	< 23	PIVA et alii(1987)
	1987	416	queijo	31	< 23	
Bélgica	1985	19	queijo	100	100-1500	BILJ et alii (1987)
Holanda	1987	34	queijo	53	< 23	PIVA et alii(1987)

^a teor no leite reconstituído

ND - não detectado

MAFFEO & LEARI (1981) realizando um levantamento com 160 amostras de leite provenientes de 115 fazendas francesas não detectaram a AFM₁. Entretanto das 380 amostras de leite estudadas por BLANC & KARLESKIND (1981), 44% se revelaram contaminadas com teores variando de 80 a 1150 ng/ L. Esses pesquisadores também verificaram que das amostras de leite em pó (222) e de queijo (343), 58 e 30% respectivamente, apresentavam níveis de 95 a 5200 ng/ L de AFM₁. FINOLI *et alii* (1983) encontraram 4 amostras de queijo, de num lote de 50, que continham de 50 a 100 ng/ L de AFM₁. RIBBERZANI *et alii* (1983) estudando 233 amostras de leite em pó para crianças, detectaram níveis de 2 a 8 ng/ L (leite reconstituído) da toxina em 25 % das amostras.

GILBERT *et alii* (1984) observaram que 6% das 409 amostras de leite e 2% das amostras de leite em pó do Reino Unido continham teores de AFM₁ maiores que 10 e 30 ng/ L, respectivamente.

Na Espanha, 7% das 95 amostras de diferentes tipos de leite (cru, pasteurizado, esterilizado, concentrado), analisados por BURDASPAL *et alii* (1983), revelaram-se contaminadas com teores de AFM₁ entre 20 e 40 ng/ L. BLANCO *et alii* (1988b) estudando 47 amostras de leite esterilizado, verificaram que 14 continham de 20 a 100 ng/ L de AFM₁.

No Japão, TAKEDA (1984) não detectou AFM₁ em treze amostras de leite analisadas em 1983.

Na Itália de um total de 52 amostras de leite coletadas diretamente de fazendas, 51% apresentaram contaminação na faixa de 5 a 146 ng/L. Das 18 amostras coletadas no comércio, 67% apresentaram teores entre 5 e 30 ng/ L (BOCCIA *et alii*, 1985). Estudos desenvolvidos no sul da Itália VISCONTI *et alii* (1985) relataram que das 106 amostras de leite cru, leite pasteurizado e leite em pó, 72% estavam contaminadas com AFM₁ na faixa de 4 a 280 ng/ kg.

BIJL *et alii* (1987) analisando queijos belgas constataram que 19 amostras continham AFM₁ em níveis entre 100 e 1500 ng/ kg.

Amostras de leite de origem alemã (225) e de origem francesa (880) analisadas por PIVA *et alii* (1987) mostraram incidência de AFM₁ em 14 e 13%, respectivamente, com níveis de contaminação inferiores a 23 ng/ L. Já com relação aos queijos franceses (82), alemães (34) e holandeses (34), a frequência de contaminação foi, respectivamente, de 20, 26 e 53%, mas apenas duas amostras francesas excederam 250 ng/ kg. No mesmo trabalho, PIVA *et alii* (1987) observaram a incidência de AFM₁ em 276 amostras de leite e 416 amostras de queijo coletadas em várias partes da Itália. Desse total, 25% das amostras de leite continham níveis de AFM₁ muito baixos, e apenas 2% excederam 50 ng/ L. Aflatoxina M₁ foi encontrada em 130 amostras de queijo (31%) mas apenas 2% ultrapassaram 250 ng/ L.

No Brasil, há o relato de DELLA ROSA & MORAES (1981) que, analisando amostras de leite pasteurizado (6) e de leite cru (4), verificou a presença de AFM₁ em três amostras de leite pasteurizado na faixa de 25 a 40 ng/ L. Já SABINO *et alii* (1989) notaram apenas uma amostra contaminada com 220 ng/ L de AFM₁ em 100 amostras de leite pasteurizado mas, dentre 50 amostras coletadas diretamente de fazendas, 21 apresentaram níveis de AFM₁ com teores entre 100 e 1680 ng/ L.

2.1.3- Métodos Analíticos

A aflatoxina M₁ é encontrada normalmente em níveis que variam entre valores menores que 10 a 5000 ng/ kg ou L (ppt) de

amostra e portanto sua determinação requer métodos de alta sensibilidade. Por outro lado, a amostragem não é problemática uma vez que esta toxina é uniformemente distribuída no leite.

Existe na literatura um grande número de trabalhos sobre métodos para determinação de AFM_1 , porém ainda, não há concordância quanto a metodologia mais adequada.

Os métodos quantitativos envolvem as seguintes etapas: (a) amostragem, (b) extração, (c) limpeza, (d) quantificação e (e) confirmação da identidade.

2.1.3.1- Extração

A AFM_1 é um componente de polaridade intermediária e os solventes mais empregados para sua extração são clorofórmio, acetona ou metanol. Estes solventes podem ser usados puros ou misturados entre si (TABELA 2). O objetivo é extrair toda AFM_1 e ao mesmo tempo, não trazer junto lipídeos, proteínas e outros interferentes.

Quando há formação de emulsão, recomenda-se o uso de uréia ou de dodecilsulfato de sódio para quebrá-la (STUBBLEFIELD et alii, 1980 ; EGMOND et alii, 1986).

Na extração com clorofórmio (STUBBLEFIELD, 1979), recomenda-se que este se encontre a uma temperatura de 35 °C. Já o método ZCI (EGMOND et alii, 1986) e o de GILBERT et alii (1984) recomendam que a extração seja feita à 4 °C, inclusive mantendo-se a amostra nesta mesma temperatura. A extração é realizada em funil de separação ao qual são adicionados 50 mL de leite, 120 mL de clorofórmio e 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio, seguidos de agitação vigorosa por um minuto.

TABELA 2- Procedimentos de extração e limpeza para aflatoxina M₁.

Produto	Extração	Limpeza ^a	Referência
leite, leite em pó, manteiga, queijo	CHCl ₃	coluna de sílica	STUBBLEFIELD (1979) BLANC <i>et alii</i> (1981) BURDASPAL <i>et alii</i> (1983) GILBERT <i>et alii</i> (1984) EGMOND <i>et alii</i> (1986) PIVA <i>et alii</i> (1987) AOAC, Proc. 980.21 (1990)
leite	CHCl ₃	CdSO ₄ /coluna de sílica	TUINSTRA & BRONGEST (1975)
leite	CHCl ₃	CCl ₄	SERRALHEIRO & QUINTA (1985)
leite	CHCl ₃	éter de petróleo	CHANG & DEVRIES (1983)
leite, queijo	CHCl ₃	ZnSO ₄ /NaOH/hexano	CHAMBON <i>et alii</i> (1983)
leite, leite em pó	acetona	n-pentano	SCHULLER <i>et alii</i> (1973)
leite	acetona	Pb(OAc) ₂ /hexano	DELLA ROSA & MORAES (1981)
leite, leite em pó, manteiga, queijo	acetona	Pb(OAc) ₂ /hexano/ coluna de celulose	STUBBLEFIELD & SHANNON (1974a) AOAC, Proc. 974.17 (1990)
leite	MeOH	hexano	SABINO <i>et alii</i> (1989)
leite	MeOH/HCl coluna extratora hidrofílica	partição com NaOH e HCl	GAUCH <i>et alii</i> (1979)
leite, iogurte queijo	MeOH/ace- tona/NaHCO ₃	coluna de sílica	DOMINGUEZ <i>et alii</i> (1987)
leite, leite em pó	Sep-Pak-C ₁₈	-	TAKEDA (1984) CARISANO & DELLA TORRE (1986)
leite	Sep-Pak-C ₁₈	coluna de sílica	FERGUSON-FOOS & WARREN (1984)
queijo	acetona/água Sep-pak C ₁₈	Sep-pak de sílica	BIJL <i>et alii</i> (1987)
leite	coluna extratora hidrofílica	-	MORTIMER <i>et alii</i> (1987)
leite	CHCl ₃ / MeOH/água	coluna de sílica	RIBERZANNI <i>et alii</i> (1983)

^a separação de substâncias interferentes em coluna cromatográfica, partição com solventes imiscíveis e precipitação com sais de metais pesados.

O método de STUBBLEFIELD (1979) foi usado por vários pesquisadores (BLANC e KARLESKIND, 1981; BURDASPAL *et alii*, 1983; CHANG & DEVRIES, 1983; GILBERT *et alii*, 1984; SERRALHEIRO & QUINTA, 1985; EGMOND *et alii*, 1986; PIVA *et alii*, 1987) e é um dos métodos oficiais da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990).

O outro método oficial da AOAC para leite e produtos lácteos, que envolve a extração de AFM₁ com acetona em liquidificador por três minutos, foi proposto por STUBBLEFIELD & SHANNON (1974a).

A extração com metanol requer em alguns casos o uso de centrifugação para que haja separação, pois a filtração é muito lenta. GAUCH *et alii* (1979) recomendaram que a extração com metanol seja feita em meio ácido.

Com o uso crescente da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de AFM₁, alguns pesquisadores também tem empregado cartucho de Sep-Pak C₁₈ para extrair a toxina de amostras de leite (TAKEDA, 1984; FERGUNSON-FOOS & WARREN, 1984; CARISANO & DELLA TORRE, 1986; BIJL *et alii*, 1987), o que permite a introdução da amostra no cromatógrafo, sem etapas prévias de limpeza.

DOMINGUEZ *et alii* (1987) desenvolveram um método para determinação de AFM₁ em leite e derivados empregando cromatografia em camada delgada (CCD). A extração é realizada com metanol-acetona em meio alcalino, usando carbonato de sódio monobásico (NaHCO₃), os lipídeos são removidos por centrifugação à baixa temperatura (-10 °C) e a AFM₁ transferida para clorofórmio. Adiciona-se NaHCO₃ para evitar a precipitação da AFM₁ junto com caseína em meio ácido. A concentração final de NaHCO₃ na solução para extração deve ser de 1%.

2.1.3.2- Limpeza

A limpeza (remoção de substâncias interferentes) visa a eliminação dos lipídeos, proteínas, substâncias fluorescentes e outras e é conseguida por cromatografia em coluna, de partição entre solventes imiscíveis e uso de clarificantes (TABELA 2).

Os clarificantes mais utilizados são sulfato de zinco, acetato de zinco, acetato de chumbo e sulfato de cádmio.

Vários métodos usam partição com éter de petróleo, hexano ou n-pentano para remoção dos lipídeos (SCHULLER *et alii*, 1973; STUBBLEFIELD & SHANNON, 1974a; GAUCH *et alii*, 1979; CHANG e DEVRIES, 1983; SABINO *et alii*, 1989).

O adsorvente mais utilizado na cromatografia em coluna é a sílica com 1% de umidade (STUBBLEFIELD, 1979). A fase clorofórmica é adicionada à coluna e a AFM₁ é eluída com mistura clorofórmio-acetona que varia de 8:2 a 6:4, dependendo do método, após lavagens com tolueno-ácido acético (9:1), hexano e hexano-éter etílico-acetonitrila (5:3:2).

SERRALHEIRO & QUINTA (1985), usando a extração com clorofórmio preconizada no método de STUBBLEFIELD (1979), empregaram tetracloreto de carbono (CCl₄) para a limpeza, enquanto CHAMBON *et alii* (1983) fizeram a clarificação com sulfato de zinco e hidróxido de sódio e o desengorduramento com hexano.

O procedimento 974.17 da AOAC (1990) emprega a celulose como adsorvente para a cromatografia em coluna. Esse método utiliza a combinação de acetato de chumbo para precipitar as proteínas, hexano para desengorduramento e coluna de celulose para remover

os interferentes restantes. A AFM₁ é eluída com hexano-clorofórmio (1:1) após lavagens iniciais com hexano-benzeno (3:1) e hexano-éter etílico (2:1). FUKAYAMA et alii (1980), utilizando este método, obtiveram recuperação média de 95% de AFM₁ em leite contendo 100 a 1000 ug/L de AFM₁, com aumento do volume de eluente empregado; do contrário a recuperação ficava em torno de 50%.

Nos trabalhos que utilizaram cartuchos de Sep-Pak-C₁₈ na extração, alguns não procederam à limpeza do extrato (TAKEDA, 1984; CARISANO & DELLA TORRE, 1986), enquanto outros a realizaram em coluna de sílica (FERGUNSON-FOOS & WARREN, 1984) ou cartucho Sep-Pak de sílica (BIJL et alii, 1987).

TAKEDA (1984) estudou a reutilização dos cartuchos de Sep-Pak-C₁₈. Realizando quatro extrações sucessivas com leite artificialmente contaminado, no mesmo cartucho, esse pesquisador obteve recuperações de 89,4 , 88,5 , 91,3 e 78,8%, demonstrando ser possível a sua reutilização. O cartucho era lavado com água e acetonitrila.

DOMINGUEZ et alii (1987) relataram que o método por eles proposto apresentou limite de detecção de 100 ng/ L, quando não usaram coluna de sílica para limpeza do extrato, e de 20 ng/L quando a usaram.

2.1.3.3- Quantificação

A quantificação da AFM₁ pode ser feita por cromatografia em camada delgada (CCD) ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (TABELA 3).

TABELA 3- Procedimentos de quantificação e confirmação para aflatoxina M₁.

Técnica Cromato-gráfica	Confirmação	Limite de detecção (ng/L ou kg)	Recuperação (%)	Referência
CCD-bi/D	-	50(leite) ^a 500(queijo)	98,0 (400) ^b 94,0 (4000)	SCHULLER <i>et alii</i> (1973)
CCD/D	TFA	100(leite)	81,4 (500)	STUBBLEFIELD (1979)
CLAE-FR	TFA/ acetilação/ CLAE-FR	5(leite)	90,0 (50)	GAUCH <i>et alii</i> (1979)
CLAE-FR	TFA	20(leite)	-	BLANC & KARLESKIND (1981)
CCD-bi/D	-	25(leite)	89,1 (100)	DELLA ROSA & MORAES (1981)
CCD-bi/V	TFA	20(leite)	78,0 (100)	BURDASPAL <i>et alii</i> (1983)
CLAE-FR	TFA	14(leite)	110,0 (100)	CHANG & DeVRIES (1983)
CLAE-FR	-	10(leite)	89,8 (10)	CHAMBON <i>et alii</i> (1983)
CLAE-FR	TFA	20(leite)	91,8 (100)	TAKEDA (1984)
CLAE-FR	TFA	10(leite e leite em pó)	-	GILBERT <i>et alii</i> (1984)
CLAE-FN	-	30(leite)	103,0 (117)	FERGUSON-FOOS & WARREN(1984)
CCD/V	p-anisaldeído	300(leite)	89,0 (1300)	SERRALHEIRO & QUINTA (1985)
CLAE-FR	TFA	2(leite)	92,3 (10)	CARISANO & DELLA TORRE (1986)
CCD/V	TFA	20(leite)	94,4 (200)	DOMINGUEZ <i>et alii</i> (1987)
CLAE/FR	TFA	1(leite) 5(queijo)	87,0 (25)	PIVA <i>et alii</i> (1987)
CLAE-FR	TFA/ acetilação	10(queijo)	94,0 (50)	BIJL <i>et alii</i> (1987)
CCD/D	CLAE/TFA	100(leite)	-	SABINO <i>et alii</i> (1989)
CCD/V	-	20(leite)	-	TUINSTRA & BRONGEEST (1975)
CCD/D	TFA	20(leite)	80,0 (50)	RIBBERZANI <i>et alii</i> (1983)
CLAE/FR	TFA	10(leite)	85,7 (100)	MORTIMER <i>et alii</i> (1987)

CCD - cromatografia em camada delgada ; CCD-bi - cromatografia em camada delgada bi-dimensional ; D - densitometria ; V - comparação visual ; CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência ; FR - fase reversa ; FN - fase normal

^a o nome entre parênteses representa o produto em que foi determinado o limite de detecção

^b os valores entre parênteses representam o nível de contaminação, em ng/L ou kg, em que foi feita a recuperação

O adsorvente usado em camada delgada é a sílica gel. Na cromatografia líquida, a coluna mais empregada é a C₁₈ (fase reversa) e o detector recomendado é o de fluorescência.

A cromatografia em camada delgada pode ser unidimensional ou bi-dimensional. Esta última, bastante empregada para amostras de queijo, permite uma melhor separação da AFM₁ das substâncias interferentes. A CCD bi-dimensional, no entanto, torna-se dispendiosa uma vez que se utiliza uma placa por amostra.

A aflatoxina M₁ é uma substância que apresenta fluorescência sob iluminação ultra-violeta. Na CCD a quantificação é realizada por comparação, visual ou densitométrica, da intensidade de fluorescência da amostra em relação ao padrão. A maioria dos trabalhos que utilizam CCD fazem a quantificação utilizando densitômetros. Na CLAE a quantificação é feita por padronização interna ou externa, sendo esta última a mais utilizada.

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência tem-se intensificado nos últimos anos, pois, além de apresentar maior sensibilidade que a CCD, em alguns métodos as amostras de leite podem ser introduzidas no cromatógrafo, após passar por um cartucho de Sep-Pak C₁₈, sem etapas prévias de limpeza.

Os métodos que utilizam CCD conseguem, em alguns casos, detectar até 10 ng/ L de AFM₁, usando CCD bi-dimensional e quantificação densitométrica (TUINSTRA & BRONGEST, 1975), enquanto utilizando CLAE com coluna de C₁₈ (fase reversa) podem chegar a 1 ng/ L para leite e 5 ng/kg para queijos (PIVA et alii, 1987).

STUBBLEFIELD (1979) conseguiu recuperações médias de 81,4 e de 76,4% de AFM₁ em leite artificialmente contaminado com 500 ng/L utilizando seu método de CCD. Em leite em pó ele obteve 80,8% para uma contaminação de 5000 ng/L. Utilizando o mesmo método, FUKAYAMA et alii (1980) recuperaram 86,3 e 90,5% de AFM₁

em leite artificialmente contaminado com 100 a 1000 ng/ L. Já os pesquisadores que usaram o mesmo método mas fizeram a quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência obtiveram recuperações médias de 87% para leite artificialmente contaminado com 25 ng/L (PIVA *et alii*, 1987), de 66,7% para leite com 100 a 8000 ng/ L (CHANG & DeVRIES, 1987) e de 77%, para leite com 16 ng/ L (SHEPHERD *et alii*, 1986).

SHEPHERD *et alii* (1986) conseguiram recuperações médias de 70, 70 e 74% de AFM₁ em leite contaminado com 160 ng/ L quando utilizaram, respectivamente, os métodos de TAKEDA (1984), de CHANG & DeVRIES, (1987) e de CHAMBON *et alii* (1983), todos empregando CLAE.

2.1.3.4- Confirmação

A confirmação da identidade da AFM₁ é feita através de reações de derivação que podem ser realizadas diretamente na camada no caso de CCD. Os reagentes utilizados são: anidrido acético, ácido clorídrico (STACK *et alii*, 1972), p-anisaldeído (SERRALHEIRO & QUINTA, 1986) e ácido trifluoroacético (TFA) (EGMOND *et alii*, 1978; STUBBLEFIELD, 1987).

A reação com p-anisaldeído em meio ácido e alcoólico produz um derivado que apresenta fluorescência verde. As reações de acetilação e hidratação são geralmente incompletas, dando uma mistura de produtos.

O TFA é o reagente mais empregado pois pode ser utilizado tanto para CCD como para CLAE, resultando na formação da aflatoxina M_{2a} (FIGURA 2). Em cromatografia em camada delgada a reação é feita diretamente na camada mas, para que seja completa, é necessário que ocorra em meio apolar como hexano (STUBBLEFIELD, 1987). Quantidades de 0,5ng de AFM₁ podem ser confirmadas pela reação com TFA.

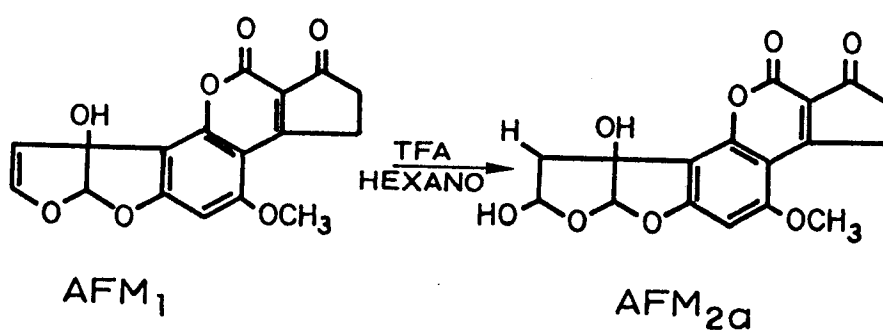


FIGURA 2 - Reação da AFM₁ com ácido trifluoroacético.

2.2- PATULINA

2.2.1- Considerações Gerais

Diferentes espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamis* são capazes de produzir patulina (FIGURA 3), dentre elas o *Penicillium expansum* que é comum na maçã deteriorada (TANIWAKI, et alii, 1989).

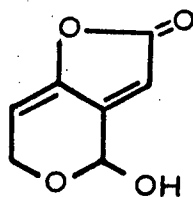


FIGURA 3 - Estrutura da patulina.

A patulina apresenta ação antibiótica contra diferentes bactérias e fungos mas, por outro lado, demonstra alta toxicidade para plantas, tecidos e células de animais (ENGEL & TEUBER, 1984).

Alguns estudos mostraram que a patulina revelou-se tóxica e mutagênica para ratos e camundongos (STOTT & BULLERMAN, 1975a, b; OSSWALD et alii, 1978; SPEIJERS et alii, 1988, BOURDIOL et alii, 1990). CIEGLER et alii (1976) observaram que a patulina apresentou efeito teratogênico para embriões de frango. Por outro lado, WRIGHT & LINDROTH (1978) não constataram ação mutagênica da patulina em linhagens de *Salmonella typhimurium* e REDDY et alii (1978) não notaram nenhum efeito teratogênico ou mutagênico em camundongos, mas sim um possível efeito fetotóxico e embrionário. GAZA et alii (1977), realizando estudos com macacos que receberam doses orais de patulina durante quatro semanas, não observaram nenhum efeito tóxico.

STOTT & BULLERMAN (1975c) relataram que a patulina pode ser produzida à temperatura de refrigeração (4 °C), em meio de cultura. A temperatura ótima de produção desta toxina pelo *P. expansum*, no entanto, é de 25 °C, na faixa de pH de 3,5 a 6,0 e atividade de água de 0,95 (SOMMER et alii, 1974; NORTHOLT et alii, 1978; BULLERMAN, 1985 ; DAMOGLU, 1985 ; WILSON & NUOVO, 1973). Em maçãs armazenadas a 4 °C por um período de 30 a 120 dias e à 25 °C por 10 a 30 dias, constatou-se produção de patulina em níveis de 150 a 311 ug/ L e de 100 a 300 ug/L, respectivamente (TANIWAKI et alii, 1989). SOMMER et alii (1974) observaram que, modificando as condições de estocagem através do aumento da concentração de CO₂ ou da redução do teor de O₂, a produção dessa toxina em maçãs estocadas a 23 °C diminuía.

SCOTT & SOMERS (1968) , estudando a estabilidade química da patulina, observaram uma redução de 15% no teor inicial em suco de maçã "in natura", artificialmente contaminado, estocado à 22 C por 7 dias e de 55% em suco de maçã enlatado, conservado à 22 C por 35 dias. Suco de uva estocado a 25 C por 33 dias apresentou perdas de 48% em média na concentração de patulina (RICE, 1980).

OUGH & CORISON (1980) observaram que esta toxina, adicionada ao suco de uva, permanecia estável à temperatura ambiente por um mês, mas a adição de 100 mg/ kg de dióxido de enxofre produzia uma redução de 54% logo após sua adição. Resultados semelhantes também foram obtidos por POHLAND & ALLEN (1970) e BURROUGHS (1977).

STINSON *et alii* (1978) constataram o desaparecimento quase que total da patulina presente em suco de maçã após duas semanas quando submetido à fermentação alcoólica. Em amostras não fermentadas e estocadas pelo mesmo período, houve apenas redução de 10% do teor inicial.

LOVETT & PEELER (1973) demonstraram que a patulina podia resistir ao aquecimento à 120 °C em pH ácido na faixa de 3,5 - 5,5 e que a elevação do pH acarretava uma diminuição da resistência. Entretanto, RALLS & LANG (1977) verificaram que 92% da patulina desaparecia após 24 horas de estocagem do vinagre de maçã artificialmente contaminado.

WHEELER *et alii* (1987) aplicaram vários tratamentos térmicos por um tempo curto (60, 70, 80 e 90 °C por 10 segundos e 90 °C por 20, 40, 80 e 160 segundos) em suco de maçã e notaram que a redução na quantidade inicial de patulina não foi superior a 19%. Reduções semelhantes foram conseguidas em cidra de maçã pasteurizada a 90 °C por 10 min. Por outro lado, TANIWAKI *et alii* (1989) processaram suco com maçã contaminada, aquecendo-o à 90 °C por 2 minutos, seguido por enlatamento à quente e outro aquecimento em água em ebulição por mais 5 minutos e obtiveram 60% de destruição da patulina inicial.

HARWING *et alii* (1973b) verificaram que a degradação microbiológica de patulina pode ocorrer em suco de maçã fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* e *S. ellipsoides*.

A Legislação Brasileira não faz nenhuma referência em relação ao limite permitido de patulina em qualquer alimento. Países como Austria, Bélgica, França, Finlândia, Noruega, Suécia e Suíça estabelecem um limite máximo de tolerância de 50 ug/ kg para sucos de frutas e a Tchecoslováquia, 20 ug/ kg para alimentos infantis (EGMOND, 1989).

2.2.2- Ocorrência em Alimentos

A patulina tem sido encontrada em sucos e purês de maçã em níveis que variam de < 1 a 3993 ug/ L (SCOTT et alii, 1972; WILSON & NUOVO, 1973 ; HARWING et alii, 1973a ; WARE et alii, 1974 ; LINDROTH & NISKANEN, 1978; BRACKETT & MARTH, 1979; BURDASPAL & PINILLA, 1979 ; STRAY, 1978; BOHUON & DRULLEAU, 1980 ; WILSON, 1981 ; ALTMAYER et alii, 1982 ; FORBITO & BABSKY, 1985; WHEELER et alii, 1987; MOLLER, 1987; MORTIMER et alii, 1985 ; WATKINS et alii, 1990 ; BURDA, 1992 ; MACHINSKY & MIDIO, 1992) e em sucos de pera e de uva, a níveis de 10 a 230 ug/ L (ALTMAYER et alii, 1982 ; MORTIMER et alii, 1985; MOLLER, 1986 ; BURDA, 1992) (TABELA 4). Em laboratório, a patulina foi produzida por inoculação em diversas frutas, farinha, grãos e queijos de fungos produtores da toxina (SCOTT & SOMERS, 1968; BUCHANAN et alii, 1974; STOTT & BULLERMAN, 1975a; HUNT et alii, 1978; SIRIWARDANA & LAFONT, 1979a e b ; OUGH & CORISON, 1980; ENGEL & TEUBER, 1984 ; HURST et alii, 1987).

Em 1972, no Canada, SCOTT et alii relataram pela primeira vez a ocorrência natural de patulina. Entre 12 amostras, uma

TABELA 4 - Incidência de patulina em frutas e sucos.

País	Ano	No. de amostras analisadas	Produto	% Contaminação	Faixa (ug/kg ou L)	Referência
Canadá	1972	12	cidra de maçã	9	1000	SCOTT <i>et alii</i> (1972)
Estados Unidos	1971	91	cidra de maçã	4	45000	WILSON & NUOVO (1973)
	1973	61	maçã deteriorada	46		HARWING <i>et alii</i> (1973a)
	1974	13	suco de maçã	61	44-309	WARE <i>et alii</i> (1974)
	1979	40	suco de maçã	60	10-350	BRACKELT <i>et alii</i> (1979)
Alemanha	1975/80	609	suco de maçã	73	20-400	MEYER (1982)
	1982	55	suco de uva, vinho	38	10-230	ALTMAYER <i>et alii</i> (1982)
Suécia	1977	66	suco de maçã	44	5-54	JOSEFSSON & ANDERSON (1977)
	1986	32	suco de maçã	100	<2,5-10	MÖLLER (1986)
		6	suco de pera	100	<2,5	
		6	pure de maçã	100	10-30	
Noruega	1978	140	suco de maçã	100	<1-220	STRAY (1978)
Finlândia	1978	100	prod. de maçã	13	6-1450	LINDROTH & NISKANEN (1978)
Espanha	1979	104	maçã	53	1-250	BURDASPAL & PINILLA (1979)
França	1980	27	suco de maçã	100	55-610	BOHUON & DRULLEAU (1980)
Nova Zelândia	1981	20	suco de maçã	15	106-216	WILSON (1981)
	1987	5	cidra de maçã	100	244-3993	WHEELER <i>et alii</i> (1987)
Reino Unido	1985	13	suco de uva	0	ND	MORTIMER <i>et alii</i> (1985)
	1985	25	suco de maçã	40	5-56	
Austrália	1988/89	113	suco de maçã	65	5-629	WATKINS <i>et alii</i> (1990)
	1989/90	258	suco de maçã, pera e frutas mistas	57	5-1130	BURDA (1992)
		70	produtos de frutas	26	5-50	
Brasil	1991	22	suco de maçã	10	8-10	MACHINSKY & MIDIO (1992)

ND - não detectado

amostra de cidra de maçã estava contaminada com 1000 ug/ L de patulina.

Nos Estados Unidos WILSON e NUOVO (1973) analisaram 100 amostras de cidra de maçã de diferentes procedências, encontrando quatro amostras com teor de patulina acima de 45000 ug/L. As cidras apresentaram alto teor de contaminação por terem sido fabricadas com maçãs deterioradas ou armazenadas por longo período. De 61 maçãs naturalmente estragadas, HARWIG *et alli* (1973a) encontraram 28 contaminadas com quantidades entre 0,02 e 17,7 mg de patulina por maçã. WARE *et alii* (1974) verificaram que 61% de 13 amostras comerciais de suco de maçã estavam contaminadas na faixa de 44 a 309 ug/ L. Posteriormente BRACKETT & MARTH (1979) analisaram quarenta amostras de suco de maçã não pasteurizados e não clarificados. Os autores constataram que 60% das amostras apresentavam-se contaminadas, com teores entre 10 e 350 ug de patulina/ L, sendo que a maioria apresentou concentrações inferiores a 50 ug/ L .

Levantamento efetuado por MEYER (1982) durante os anos de 1975 a 1980, constatou-se que 73% de 609 amostras alemãs de suco de maçã apresentavam-se contaminadas com patulina, com teores de 20 e 400 ug/ L. ALTMAYER *et alii* (1982) analisando 55 amostras de suco de uva e vinho e registraram que 38% estavam contaminadas com teores entre 10 e 230 ug/ L sendo que 16% continham níveis acima de 50 ug/ L.

Na Suécia JOSEFSSON & ANDERSON (1977) analisaram 66 amostras de suco de maçã e observaram que 29 (44%) amostras continham acima de 5 ug/ L de patulina, sendo 54 ug/ L a maior concentração obtida. MOLLER (1986) investigou a presença de patulina em amostras de suco de maçã (320, suco de pera (6) e pure de maçã

(6). A totalidade das amostras apresentaram teores abaixo de 50 ug/ L ou kg, limite permitido pela legislação sueca.

Na Noruega a presença de patulina foi verificada em 140 amostras de suco de maçã na faixa de <1 a 220 ug/ L (STRAY, 1978). LINDROTH e NISKANEN (1978) observaram, na Finlândia, em 100 amostras de maçã que 13 delas continham patulina entre 6 a 1450 ug/ L. Os autores Eles também analisaram 64 sucos de maçã importados, dos quais 13 apresentaram teores na faixa de 50 a 690 ug/L. As amostras de damasco seco, suco de pêssego e molho de tomate estavam isentas de contaminação.

BURDASPAL & PINILLA (1979) analisaram 104 amostras espanholas de maçã, detectando patulina em 53% das amostras, com concentrações variando de 1 a 250 mg/ kg.

Em 1980, na França BOHUON & DRULLEAU encontraram patulina em amostras de suco de maçã concentrado com níveis entre 55 e 610 ug/ kg.

Na Nova Zelândia das 20 amostras de suco de maçã avaliadas constatou-se a presença de patulina em três delas, com níveis de 106, 133 e 216 ug/ L (WILSON, 1981). Em 1987, WHEELER et alii analisaram cinco amostras de cidra de maçã pasteurizada e detectaram patulina na faixa de 244 a 3993 ug/ L.

No Reino Unido, MORTIMER et alii (1985) não encontraram a patulina em 13 amostras de suco de uva. Por outro lado, das 25 amostras de suco de maçã, uma continha 56 ug/ L e nove delas apresentavam teores entre 5 e 30 ug de patulina/ L.

No período de 1988/1989, de 113 amostras australianas de suco de maçã analisadas, 65% delas apresentaram teores de patulina entre 5 e 629 ug/ L (WATKINS et alii, 1990). Nesse mesmo

país BURDA (1992) verificou que 57,5% de 258 amostras de sucos de maçã, pera e frutas mistas estavam contaminadas com a toxina (5 a 1130 ug/ L). Também em 70 outros produtos de frutas(geléia, pures, massa, doces) analisados, a patulina encontrava se presente em 26% deles com níveis de 5 a 50 ug/ kg.

No Brasil, MACHINSKY & MIDIO (1992) analisaram 22 amostras de suco de maçã, das quais duas apresentaram teores de 8 e 10 ug de patulina por litro de suco.

2.2.3- Métodos Analíticos

A maioria dos métodos para determinação de patulina foram desenvolvidos para suco de maçã e estão mostrados na TABELA 5. SCOTT & KENNEDY (1973) estabeleceram um método que consiste da extração da toxina com acetato de etila, seguido de limpeza do extrato em coluna de sílica gel. Após a eluição da coluna com a mistura benzeno-acetato de etila (3:1), o extrato é evaporado até a secura e a toxina quantificada por cromatografia em camada delgada (CCD) por comparação visual com o padrão. Esses pesquisadores utilizaram ainda MBTH (3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona) para aumentar a fluorescência amarela que a patulina apresenta sob iluminação ultravioleta. Este método foi submetido a um estudo colaborativo por SCOTT, em 1974, onde se conseguiu recuperações acima de 69,8% da quantidade de patulina adicionada (50 a 340 ug/ L) e limite de detecção de 10 ug/ L, tendo então se tornado o método oficial da AOAC (proc.974.18,1990).

TABELA 5- Procedimentos de extração, limpeza e quantificação para patulina.

Produto	Extração	Limpeza ^a	Técnica cromato- gráfica	Limite detecção (ug/L)	Referência
suco de maçã	EtOAc	coluna de sílica	CCD/V	10	SCOTT & KENNEDY(1973) proc. 974.18 (AOAC, 1990)
suco de maçã	EtOCc	coluna de sílica	CCD-bi	20	LINDROTH & NISKANEN(1978)
suco de maçã	EtOAc	coluna de sílica	CCD/D	12,5	OUGH & CORISON (1978)
suco de maçã	EtOAc	coluna de sílica	CLAE/FN	11	WARE <i>et alii</i> (1974)
suco de maçã	EtOAc	coluna de sílica	CLAE/FR	1	STRAY (1978)
suco de maçã	EtOAc	coluna de sílica	CLAE/FR	3	WILSON (1981)
suco de maçã	isopropanol/ EtOAc	coluna de sílica	CCD/D	0,010 ^b	SIRIWARDANA & LAFONT(1979b)
suco de maçã	EtOAc	Na ₂ CO ₃ 1,5%	CLAE/FR	5	MÖLLER & JOSEFSSON(1980)
suco de maçã	EtOAc	Na ₂ CO ₃ 1,5%	CLAE/FR	0,32 ^c	FORBITO & BABSKY (1985)
suco de frutas/ produtos de frutas	EtOAc	Na ₂ CO ₃ 1,5%	CLAE/FR	5	BURDA (1992)
suco de maçã	EtOAc/ diálise bifásica	-	CCD/V	30	PRIETA <i>et alii</i> (1992)

CCD - cromatografia em camada delgada; CCD-bi - cromatografia em camada delgada bi-dimensional; D - densitometria; V - comparação visual; CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência; FR - fase reversa; FN - fase normal

^a separação de substâncias interferentes em coluna cromatográfica e partição em solventes imiscíveis.

^b quantidade de padrão visualizado na placa cromatográfica.

^c quantidade de padrão, em ng/ injeção

LINDROTH & NISKANEN (1978) empregaram o método de SCOTT & KENNEDY (1973), utilizando para quantificação CCD bi-dimensional, e conseguiram um limite de detecção de 20 ug/ L. OUGH & CORISON (1980) aplicaram o mesmo método , fazendo a quantificação por densitometria, e conseguiram reduzir o limite de detecção para 12,5 ug/ L.

Alguns pesquisadores utilizaram o método de SCOTT & KENNEDY (1973), mas fizeram a quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector por absorvância no UV. WARE et alii (1974), empregando coluna de sílica (fase normal) e a mistura isooctano-diclorometano- metanol (84:15:1) como fase móvel, obtiveram um limite de detecção de 11 ug/ L com recuperação superior à 85%. Em 1975, WARE substituiu a fase móvel pela mistura isooctano-éter etílico-ácido acético (750: 250: 0,5) e obteve a eluição da patulina antes do principal interferente presente que é o hidroximetilfurfural. Já STRAY (1978), usando CLAE de fase reversa com uma coluna de C₁₈ (Partisil-10 ODS) e água como fase móvel, conseguiu recuperação de 82,6% e limite de detecção de 1 ug/ L. O pico da patulina foi monitorado a 280 nm. WILSON (1981) usando 1% de metanol aquoso como fase móvel, detectou limites de 3 ug/ L a 254 nm.

SIRIWARDANA & LAFONT (1979b) empregaram a mistura isopropanol-acetato de etila (6:4) para extração de patulina em suco de maçã, seguida da adição de cloreto de sódio para separar a fase orgânica da fase aquosa. Após limpeza em coluna cromatográfica de sílica, foi feita a cromatografia em camada delgada e a quantificação por densitometria após revelação com anilina e aquecimento da placa à 110 °C por 10 minutos. Recuperações superiores a 84% e um limite de visualização na placa de 0,010 ug foram conseguidas.

MOLLER & JOSEFSSON (1980) realizaram a extração com acetato de etila, removendo os interferentes por partição com solução de carbonato de sódio 1,5%. Usando água destilada como fase móvel e coluna de C₁₈ (Spherisorb ODS-1) para CLAE e monitorando a patulina a 276 nm, conseguiram limite de detecção de 5 ug/ L e recuperações acima de 75%. Já FORBITO & BABSKY (1985), utilizando a mesma extração, mas empregando 0,8% de tetrahidrofurano (THF) aquoso como fase móvel e monitorando a patulina a 254 nm, conseguiram recuperações acima de 75%, sendo possível detectar até 0,32 ng de padrão de patulina. Também BURDA (1992) utilizou a mesma extração e 2% de ácido acético como fase móvel e obteve como limite de detecção, 5 ug de patulina/ L .

PRIETA *et alii* (1992) determinaram patulina em suco de maçã utilizando extração bifásica com acetato de etila e separação em CCD, conseguindo como limite de detecção 30 ug/ L.

2.3- ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO

2.3.1- Considerações Gerais

O ácido ciclopiazônico (CPA) (FIGURA 4) é uma substância produzida por várias espécies de *Penicillium* e de *Aspergillus* (HOLZAPFEL, 1968 ; DORNER et alii, 1983 ; MORRISSEY et alii, 1985; TRUCKSESS et alii, 1987). Estudos com espécies aflatoxigênicas e não aflatoxigênicas de *Aspergillus flavus* tem mostrado que existem cepas que podem produzir apenas aflatoxinas, apenas CPA, as duas toxinas ou nenhuma delas (GALLAGHER et alii, 1978). O outro fungo produtor de aflatoxinas, *Aspergillus parasiticus* produz AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ mas não CPA, enquanto que o *A. flavus* pode sintetizar AFB₁ e AFB₂ além do ácido ciclopiazônico, mas raramente AFG₁ e AFG₂ (DORNER et alii, 1984).

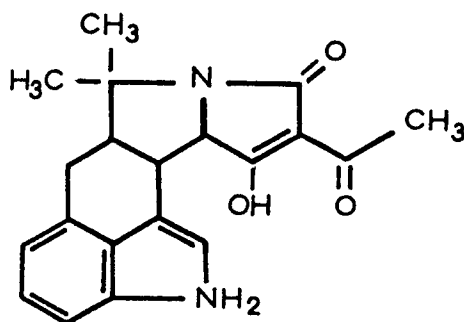


FIGURA 4 - Estrutura do ácido ciclopiazônico.

A toxicidade do ácido ciclopiazônico foi demonstrada em várias espécies de animais incluindo ratos, frangos, cães e cobaias sendo os principais órgãos alvo o fígado, o rim e o sistema digestivo (PURCHASE, 1971 ; DORNER et alii, 1983 ; MORRISEY et alii, 1985 ; NISHIE et alii, 1985 ; NORRED et alii, 1985 : NUEHRING et alii, 1985; RICHARD et alii, 1986 ; CULLEN et alii, 1988 ; VOSS et alii, 1990). WEHNER et alii (1978) relataram que o ácido ciclopiazônico não era mutagênico para *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100. Todavia, SORENSON et alii (1984) observaram que o ácido ciclopiazônico era mutagênico para a *Salmonella typhimurium* TA98 e que, na presença de AFB₁, as toxinas apresentavam efeito aditivo. Vários trabalhos tem mostrado um efeito sinergístico entre aflatoxinas e ácido ciclopiazônico em ratos e macacos (SMITH et alii, 1992; COLE, 1986; MORRISSEY et alii, 1987 ; JASKIEWICZ et alii, 1988 ; PIER et alii, 1989).

COLE (1986) reavaliou os relatos sobre a etiologia da clássica síndrome da doença "X" dos peruzinhos (incidente ocorrido em 1960 na Inglaterra, no qual a morte de 100.000 peruzinhos foi atribuída a contaminação por aflatoxina de torta de amendoim proveniente do Brasil). Alguns sinais clínicos descritos na ocasião não eram típicos de aflatoxicose e, a luz dos conhecimentos atuais, considera-se que os mesmos poderiam ser atribuídos ao ácido ciclopiazônico que também é produzido pelo *Aspergillus flavus*.

NORRED et alii (1987), relatando estudos sobre ingestão, distribuição e excreção do ácido ciclopiazônico em ratos, verificaram o alto grau de distribuição do ácido ciclopiazônico no músculo dos animais. Esses pesquisadores observaram que, 72 horas após a administração da toxina, mais de 10% persistia no músculo do rato e que, se a distribuição do ácido ciclopiazônico

em animais domésticos ocorrer de forma semelhante, os seres humanos poderiam estar mais expostos a toxina através do consumo de carnes. Os mesmos autores também observaram a presença de ácido ciclopiazônico na carne após administração oral da toxina em frangos (NORRED et alii, 1988).

RAO & HUSAIN (1985) associaram a síndrome "Kodua poisoning" em animais e seres humanos com a presença do ácido ciclopiazônico presente em sementes de "kodo millet" (*Paspalum scobriculatum*) em certas regiões da Índia (teor de ácido ciclopiazônico não especificado). *Aspergillus flavus* e *A. tamarii*, ambos produtores de ácido ciclopiazônico, também foram isolados das sementes tóxicas.

2.3.2- Ocorrência em Alimentos

Esta toxina já foi detectada em vários alimentos como queijos, carnes, amendoim e milho (LeBARS, 1979; GALLAGHER et alii, 1978; LANSDEN & DAVIDSON, 1983; DUTTON & WESTLAKE, 1985; LANSDEN, 1986; NORRED et alii, 1987; TRUCKSESS et alii, 1987; WIDIASTUTI et alii, 1988; CHANG & BIDASEE, 1990; URANO et alii, 1992b) (TABELA 6).

A primeira ocorrência natural de ácido ciclopiazônico foi relatada por GALLAGHER et alii (1978), em seis amostras de milho americano contaminado com aflatoxinas. LANSDEN & DAVIDSON (1983) detectaram ácido ciclopiazônico em 21 dentre 27 amostras de amendoim sem casca e em 4 dentre 21 amostras com casca na faixa de 32 a 6525 e de 32 a 130 ug/ kg, respectivamente. Também foi

TABELA 6 - Incidência de ácido ciclopiazônico em alimentos.

País	Ano	No. de amostras analisadas	Produto	% Contaminação	Faixa (ug/kg)	Referência
Estados Unidos	1978	6	milho	100		GALLAGHER <i>et alii</i> (1978)
	1983	27	amendoim sem casca	78	32-6525	LANSDEN & DAVIDSON (1983)
	1983	21	amendoim com casca	19	32-1300	
	1992	50	amendoim	90	<50-2900	URANO <i>et alii</i> (1992b)
	1992	45	milho	51	<25-2800	
França	1979	20	casca de queijo Camembert	55	50-150	LeBARS (1979)
África do Sul	1985	794	produtos agrícolas	0	--	DUTTON & WESTLAKE (1985)
Indonésia	1985/86	26	milho	80	30-9220	WIDIASTUTI <i>et alii</i> (1988)
Trinidade	1990	3	milho mofado	100	1900-4000	CHANG-YEN & BIDASEE (1990)
		4	ração mofada	100	1000-2050	

observada a presença de aflatoxinas nas amostras contaminadas com ácido ciclopiazônico. De 50 amostras de amendoim e 45 de milho analisadas durante o ano de 1990 (URANO *et alii*, 1992b), observou-se que 90 e 51%, respectivamente, estavam contaminadas com ácido ciclopiazônico. O nível de contaminação variou entre < 25 a 2900 ug/ kg em 87% das amostras de milho e em 100% das de amendoim. Aflatoxinas também estavam presente nas amostra contaminadas.

Por outro lado, DUTTON & WESTLAKE (1985) não encontraram ácido ciclopiazônico em 794 amostras de produtos agrícolas sul-africanos, incluindo 155 amostras de milho das quais 25% continham aflatoxinas.

Na França LeBARS (1979) detectou ácido ciclopiazônico na casca de queijos Camembert, na faixa de 50 a 1500 ug/ kg, mas não na parte interna dos mesmos. *P. camemberti* foi isolado dos queijos e inoculado em meio de cultura onde produziu a toxina.

WIDIASTUTI *et alii* (1988) encontraram ácido ciclopiazônico em 21 das 26 amostras de milho da Indonésia, coletadas no período de setembro de 1985 a setembro de 1986, com teores variando entre 30 e 9220 ug/ kg (média de 1915 ug/ kg). Todas as amostras contaminadas continham aflatoxinas, sete delas apresentavam também zearalenona e uma outra, ocratoxina.

Em Trinidad CHANG-YEN & BIDASEE (1990) encontraram ácido ciclopiazônico em 4 amostras de ração com níveis entre 1000 e 4000 ug/ kg.

GALLAGHER *et alii* (1978) relataram que tanto as cepas aflatoxigênicas de *Aspergillus flavus* como as não aflatoxigênicas podiam produzir ácido ciclopiazônico. LANSDEN & DAVIDSON (1983) encontraram ácido ciclopiazônico em amendoim como resultado da

contaminação por *Aspergillus flavus*. Estes resultados sugeriram a possibilidade dos seres humanos e animais estarem provavelmente expostos simultaneamente a aflatoxinas e ao ácido ciclopiazônico. Por outro lado, DORNER et alii (1984) estudaram 47 cepas de *Aspergillus parasiticus* das quais nenhuma produziu ácido ciclopiazônico mas somente aflatoxina do grupo B e G.

2.3.3- Métodos Analíticos

Poucos são os métodos disponíveis para determinação de ácido ciclopiazônico (CPA) (TABELA 7). Em 1979, LeBARS extraiu o ácido ciclopiazônico da casca de queijos com mistura clorofórmio-metanol, fazendo a remoção dos interferentes com solução de acetato de chumbo e desengorduramento com hexano. Um limite de detecção de 20 ug/ kg foi obtido em CCD com quantificação por comparação visual.

LANSDEN & DAVIDSON (1983) desenvolveram um método para determinação de ácido ciclopiazônico em amendoim no qual a toxina foi extraída com a mistura clorofórmio-metanol, após a amostra ter sido previamente desengordurada. A remoção dos interferentes do extrato foi feita por partição com solução aquosa de bicarbonato de sódio seguida por acidificação e repartição com clorofórmio. A quantificação foi realizada em camada delgada de sílica gel por comparação visual com padrão. O limite de detecção do método foi de 32 ug/kg e a confirmação da identidade foi realizada através da reação com p-dimetilaminobenzaldeído (reagente de Ehrlich), resultando um composto de cor violeta.

TABELA 7- Procedimentos de extração, limpeza e quantificação para ácido ciclopiazônico.

Produto	Extração	Limpeza ^a	Técnica cromato- gráfica	Limite detecção (ug/kg)	Referência
casca de queijo	CHCl ₃ / CH ₃ OH	Pb(OAc) ₂ / hexano	CCD/V	20	LeBars (1979)
amendoim	CHCl ₃ / CH ₃ OH	hexano/ NaHCO ₃	CCD/V	32	LANSDEN & DAVIDSON (1983)
amendoim/ milho	CHCl ₃ / CH ₃ OH	hexano/ NaHCO ₃	CLAE/FR	4	LANSDEN (1984)
amendoim/ milho	CHCl ₃ / CH ₃ OH	hexano/ NaHCO ₃	CCD/D	125	LANSDEN (1986)
carne de frango	CHCl ₃ / CH ₃ OH	coluna de sílica	CLAE/FR	16	NORRED <i>et alii</i> (1987)
milho	CHCl ₃ / H ₃ PO ₄	Sep-pak de sílica	CLAE/FN	0.2 ^b	GOTO <i>et alii</i> (1987)
arroz milho trigo	CHCl ₃ / CH ₃ OH	---	C(560 nm)		RATHINAVELU & SHANMUGASUNDARAM (1984)
milho ração	CHCl ₃ / CH ₃ OH	coluna de sílica	C(580 nm)	80	CHANG-YEN & BIDASEE(1990)
amendoim milho	CH ₃ OH/ NaHCO ₃	Sep-pak de sílica	CLAE/FR	50 100	URANO <i>et alii</i> (1992a)

CCD - cromatografia em camada delgada; CCD-bi - cromatografia em camada delgada bi-dimensional; D - densitometria; V - comparação visual; CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência; FR - fase reversa; FN - fase normal

^a separação de substâncias interferentes em coluna cromatográfica, partição com solventes imiscíveis e precipitação com sais de metais pesados

^b quantidade de padrão, em ng/injeção

LANSDEN (1984), utilizando a mesma extração para amostras de amendoim e de milho, fez a quantificação por CLAE com coluna C₁₈ e detector por ultra-violeta a 284 nm, usando a mistura de 40% de acetonitrila, 30% de isopropanol, 1% de acetato de amônia contendo 1 mM de acetato de zinco como fase móvel. Esse pesquisador conseguiu um limite de detecção de 4 ug/ kg e em 1986, realizando a quantificação em CCD por densitometria, obteve um limite de detecção de 125 ug/ kg.

NORRED *et alii* (1987) determinaram ácido ciclopiazônico em amostras de carne de frango, alimentados com ração contaminada com ácido ciclopiazônico, fazendo a extração com clorofórmio-metanol, a remoção dos interferentes em coluna de sílica e a quantificação por CLAE nas mesmas condições cromatográficas que LANSDEN (1984), obtendo assim 16 ug/ kg como limite de detecção.

GOTO *et alii* (1987), utilizando cartucho de Sep-Pak de sílica para a remoção dos interferentes e CLAE com coluna de sílica, acetato de etila-2-propanol-25% amônia aquosa (55:20:5) como fase móvel e detector ultravioleta a 284 nm, conseguiram um limite de detecção de 0,2 ng/ injeção. Tentativas feitas com coluna de C₁₈ não mostraram separação eficiente.

RATHINAVELY & SHANMAGASUNDARAM (1984) desenvolveram um método colorimétrico quantitativo para ácido ciclopiazônico, baseado na reação de cor da toxina com o reagente de Ehrlich (p-dimetilamino benzaldeído). A micotoxina extraída com metanol e isolada dos interferentes por CCD, ao reagir com o reagente citado desenvolve cor estável por 30 min. A reação obedece a lei de Beer entre 5 e 50 ug/ mL e a leitura é feita a 560 nm. CHANG-YEN & BIDASEE (1990) determinaram espectrofotometricamente o ácido ciclopiazônico em rações e milho pela mesma reação de cor. Os procedimentos empregados para extração e limpeza foram os mesmos

aplicados por Norred *et alii* (1987). A faixa linear da curva ficou entre 5 e 100 ug/ mL e o limite de detecção foi de 80 ug/ kg.

URANO *et alii* (1992a) estabeleceram um método para extração de ácido ciclopiazônico de amendoim e milho com mistura metanol - 2% NaHCO₃ (7:3). Cartucho de Sep-pak de sílica foi usado para remoção dos interferentes e a quantificação foi feita por CLAE com coluna C₁₈ e gradiente linear de 0-4mM de sulfato de zinco em 85% de metanol como fase móvel. O ácido ciclopiazônico foi monitorado a 279 nm sendo obtidos limites de detecção de 50 e 100 ug/ kg para amendoim e milho, respectivamente.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- AMOSTRAGEM

Para o levantamento da incidência das micotoxinas, amostras de leite e derivados para determinação de aflatoxina M_1 (AFM_1), amostras de sucos de frutas para patulina e amostras de amendoim e milho para ácido ciclopiazônico (CPA) foram compradas ao acaso em diferentes supermercados, armazéns e padarias da cidade de Campinas nos anos de 1989, 1990, 1991 e 1992.

Foram utilizadas, para determinação de aflatoxina M_1 204 amostras de leite e derivados assim distribuídos: leite pasteurizado dos tipos A, B e C (103), de leite em pó integral e desnatado (35), de queijo dos tipos prato, minas e mozzarella (36), e de iogurte dos sabores natural e morango (30). Duas marcas de queijo tipo minas, uma do tipo prato e outra do tipo mozzarella foram procedentes do estado de Minas Gerais. As demais marcas de queijo foram oriundas do estado de São Paulo.

Foram analisadas, para determinação de patulina 65 amostras de sucos de frutas, a saber: maçã (20), uva (17), abacaxi (10), mamão (3), goiaba (6), banana (3) e manga (6)). Foram analisadas também 24 amostras de frutas, sendo 15 amostras de maçã, 6 de mamão e 3 de manga. No caso de sucos concentrados, efetuou-se a diluição de acordo com as instruções do fabricante.

Em relação à presença do ácido ciclopiazônico, foram utilizadas 12 amostras de amendoim cru, 16 de produtos de

amendoim, paçoca, 8 de farinha de milho, 8 de fubá e 9 de milho de pipoca.

3.2-PREPARO DE AMOSTRAS ARTIFICIALMENTE

CONTAMINADAS

Com vistas à avaliação dos métodos, amostras foram artificialmente contaminadas, conforme descrito a seguir. A pureza dos padrões de AFM₁, patulina e ácido ciclopiazônico (Sigma, EUA), foi verificada através de CCD e espectroscopia de absorção.

3.2.1- Aflatoxina M₁

a) leite em pó: as quantidades necessárias de padrão, dissolvidas na mistura benzeno-acetonitrila (9:1), foram gotejadas sobre 5 g da amostra de forma a evitar que a solução atingisse as paredes e deixando-se que o solvente se evaporasse de um dia para outro.

b) leite pasteurizado: nesse caso, a quantidade necessária de padrão, dissolvido em acetonitrila, foi adicionada a 50 mL de amostra, seguida de homogeneização por agitação.

3.2.2- Patulina

A uma alíquota conhecida do padrão (dissolvido em clorofórmio) colocada num tubo com tampa de rosca e levada à secura sob fluxo de nitrogênio adicionou-se um volume conhecido de suco de maçã e procedeu-se à agitação em banho de ultrassom por 1 minuto.

3.2.3- Ácido Ciclopiazônico

As quantidades de padrão necessárias (dissolvidas em metanol) foram gotejadas sobre 50 g de amendoim ou milho moído, evitando que a solução atingisse as paredes do recipiente, sendo o solvente deixado a evaporar de um dia para outro.

3.3- DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M₁

Com vistas à avaliação dos métodos de determinação de AFM₁, foram utilizadas amostras de leite pasteurizado artificialmente contaminado com 1000 ng/L de AFM₁ e amostras de leite em pó, artificialmente contaminadas com 3000 ng/L.

3.3.1- Avaliação da Extração e Limpeza

Foram avaliados vários métodos existentes na literatura assim como tentativas de novos procedimentos. Na TABELA 8 estão

TABELA 8 - Esquema da avaliação da extração e limpeza.

(continua)

Amostra	Solventes extratantes	Limpeza
50 mL de leite	metanol puro (200mL)	partição com hexano CuSO ₄ .5H ₂ O 10% (150mL) FeCl ₃ básico (200mL)/ CuCO ₃ (1g) (NH ₄) ₂ SO ₄ 30% (150mL) Pb(AcO) 20% (20mL)/ H ₂ O (100mL) ZnSO ₄ 15% (150mL)
50 mL de leite	metanol/ NaCl 5%(9:1) (200 mL)	partição com hexano CuSO ₄ .5H ₂ O 10% (150mL) FeCl ₃ básico (200mL)/ CuCO ₃ (1g) (NH ₄) ₂ SO ₄ 30% (150mL) Pb(AcO) 20% (20mL)/ H ₂ O (100mL) ZnSO ₄ 15% (150mL)
50 mL de leite	metanol/acetona(5:2) (70mL)/ NaHCO ₃ 8,4% (7mL)	coluna de sílica
50 mL de leite	acetona pura (200mL)	ZnAcO 15%/NaCl 15%(1:1) (150mL) CuSO ₄ .5H ₂ O 10% (150mL) FeCl ₃ básico (200mL)/ CuCO ₃ (1g) Pb(AcO) 20% (20mL)/ H ₂ O(100mL) Pb(AcO) 20% (20mL)/ H ₂ O(100mL)/ hexano/ coluna de celulose Pb(AcO) 20% (20mL)/ H ₂ O(100mL)/ hexano/ coluna de sílica Zn(AcO) 15% (150mL) ZnSO ₄ 15% (150mL)
50 mL de leite	acetona/água(85:15) (200 mL)	ZnAcO 15%/NaCl 15%(1:1) (150mL) CuSO ₄ .5H ₂ O 10% (150mL) FeCl ₃ básico (200mL)/ CuCO ₃ (1g)

TABELA 8 - Esquema da avaliação da extração e limpeza.

(conclusão)		
Amostra	Solventes extratantes	Limpeza
50 mL de leite	acetona/NaCl 5%(9:1) (200 mL)	Pb(AcO) 20% (20mL)/ H ₂ O(100mL)
		Pb(AcO) 20% (20mL)/ H ₂ O(100mL)/ hexano/ coluna de celulose
		Pb(AcO) 20% (20mL)/ H ₂ O(100mL)/ hexano/ coluna de silica
		Zn(AcO) 15% (150mL)
		ZnSO ₄ 15% (150mL)
		ZnAcO 15%/NaCl 15%(1:1) (150mL)
		CuSO ₄ .5H ₂ O 10% (150mL)
		FeCl ₃ básico (200mL)/ CuCO ₃ (1g)
		Pb(AcO) 20% (20mL)/ H ₂ O(100mL)
		Pb(AcO) 20% (20mL)/ H ₂ O(100mL)/ hexano/ coluna de celulose
100 mL de leite	acetona (300mL)	Pb(AcO) 20% (20mL)/ H ₂ O(100mL)/ hexano/ coluna de silica
		Zn(AcO) 15% (150mL)
		ZnSO ₄ 15% (150mL)
		Pb(AcO) 20% (20mL)/ partição para hexano/ coluna de celulose
50 mL de leite	clorofórmio(120mL)	coluna de silica
		coluna C ₁₈
		partição com metanol/ partição com CCL ₄
		partição com metanol/ partição com éter de petróleo
		partição com metanol/ partição com hexano
		partição com metanol/ partição com éter butílico

relacionadas todas as tentativas que foram feitas com relação a escolha do solvente extratante e sobre a melhor maneira de se remover os interferentes. Cada teste foi realizado em triplicata.

No caso do leite pasteurizado usou-se 50 mL de amostra e para leite em pó, 5 g de amostra diluídas em 50 mL de água destilada. As amostras de queijo foram raladas e homogeneizadas antes da retirada de uma alíquota de 15 g. Para as amostras de iogurte, 30mL foram misturados com 20 mL de água antes de se proceder a análise.

Para as extrações foram avaliados os solventes utilizados nos vários métodos existentes na literatura nas condições indicadas ou com algumas modificações. Os solventes empregados foram:

- metanol puro - 200mL (Sabino *et alii*, 1989)
- metanol + 5% NaCl (9:1) - 200 mL
- metanol + acetona (5:2) - 70 mL (Dominguez *et alii*, 1987)
- acetona pura - 200 e 300 mL (proc. 974.17, AOAC, 1990)
- acetona + água (85:15) - 200 mL (Romer, 1975)
- acetona + 5% NaCl (9:1) - 200 mL
- clorofórmio puro - 120 mL (proc. 980.21, AOAC 1990)

O procedimento para extração com metanol puro foi o proposto por SABINO *et alii* (1989). Na tentativa de eliminar-se o problema de emulsão, também foi utilizado metanol-NaCl 5% (SOARES &

RODRIGUEZ-AMAYA, 1989), seguindo o mesmo procedimento para metanol puro. A extração com a mistura metanol-acetona (5:2) foi realizada de acordo com DOMINGUEZ *et alii* (1987).

O esquema 974.17 da AOAC (1990) (FIGURA 5) descreve a extração de 100 mL de amostra de leite pasteurizado com acetona pura. Tentativas de se usar 50 mL de amostra em vez dos 100 mL originais foram feitas, assim como a extração com a mistura acetona-água (ROMER, 1975) e acetona salina .

No caso do uso de clorofórmio puro como solvente extrator, os métodos utilizados foram o procedimento 980.21 da AOAC (1990) (FIGURA 6) e o proposto por SERRALHEIRO & QUINTA (1985).

Com relação ao uso de agentes clarificantes para remoção de substâncias indesejáveis, foram testados os seguintes sais:

- sulfato de cobre 10% (SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989)
- sulfato de amônia 30% (SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989)
- sulfato de zinco 15%
- acetato de zinco 20% (CHAMBON *et alii*, 1983)
- acetato de chumbo 20%
- cloreto férrico (2 g/ 30 mL de água + 170 mL 0,2N NaOH) / 1g de carbonato de cobre básico (ROMER, 1975)
- acetato de zinco 15% / cloreto de sódio 15%

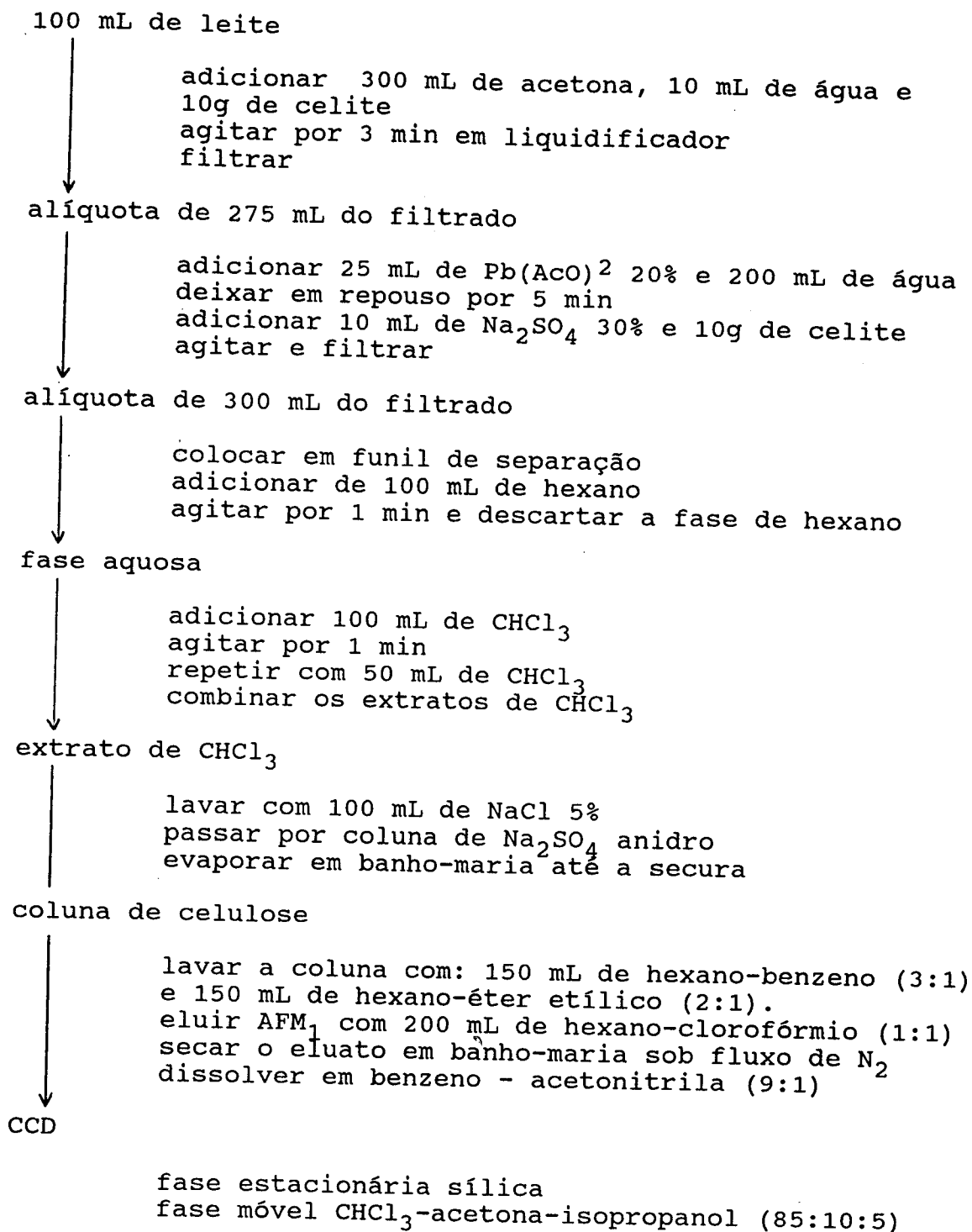


FIGURA 5- Esquema para determinação de AFM_1 pelo procedimento 974.17 da AOAC (1990).

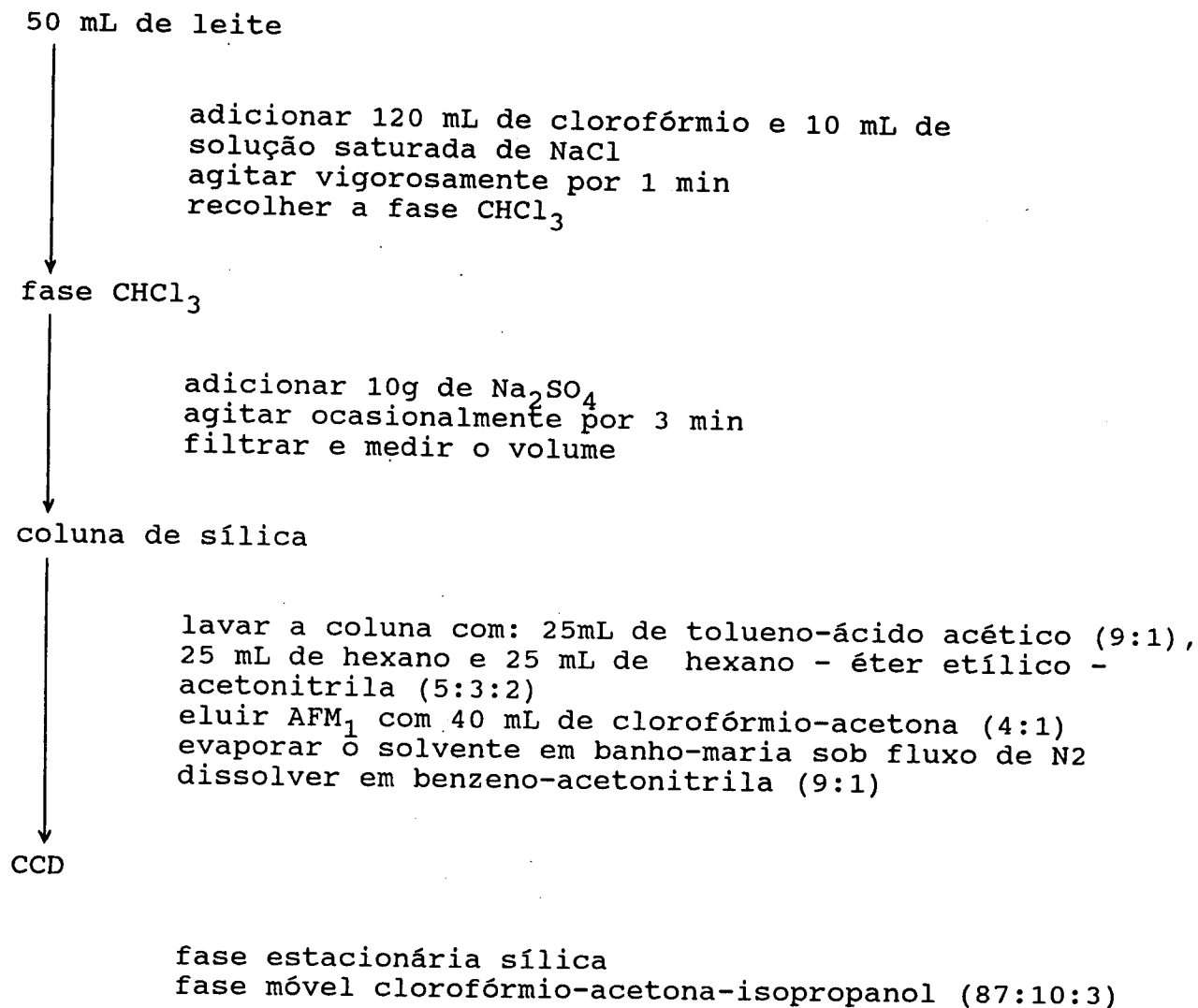


FIGURA 6- Esquema para determinação de AFM_1 , de acordo com o procedimento 980.21 da AOAC (1990).

Para a remoção dos lipídeos foi efetuado desengorduramento com hexano ou éter de petróleo antes da etapa de partição com clorofórmio.

Foram testadas também as colunas cromatográficas de celulose (MERCK, Alemanha) (proc. 974.17) (FIGURA 5) e de sílica gel (MERCK, Alemanha) (AOAC, 1990, proc. 980.21) (FIGURA 6) para limpeza.

Na coluna de celulose, após aplicação do extrato dissolvido em clorofórmio-benzeno-hexano (1:2:10), a coluna foi lavada com os eluentes: hexano-benzeno (3:1) (150 mL) e hexano-éter etílico (2:1) (150 mL). Usou-se 200 mL de hexano-clorofórmio (1:1) para eluir a AFM₁ e o eluato foi evaporado até a secura em banho-maria sob fluxo de nitrogênio.

Na limpeza em coluna de sílica, o extrato dissolvido em clorofórmio foi colocado na coluna e, após escoamento, foram adicionados os seguintes eluentes: tolueno-ácido acético (9:1) (25 mL), hexano (25 mL) e hexano-éter etílico-acetonitrila (5:3:2) (25 mL), que foram descartados. A seguir a AFM₁ foi eluída com clorofórmio-acetona (4:1) (40 mL) e o eluato posteriormente evaporado até a secura em banho-maria sob fluxo de nitrogênio.

Considerando que alguns pesquisadores empregaram com sucesso o cartucho descartável de Sep-Pak C₁₈ para extração de AFM₁ e limpeza de amostras de leite a serem utilizadas em CLAE, foi realizada uma tentativa de proceder à limpeza da amostra em coluna empacotada de C₁₈. Nesse caso a AFM₁, após extração com clorofórmio, foi transferida para acetona e o extrato colocado numa coluna de vidro (8x300 mm) contendo sílica-C₁₈ (0,5 g) (50 um, SEPARATION TECHNOLOGY, EUA) como fase estacionária, e a AFM₁ eluída com acetona.

Foi realizada também uma tentativa de se reaproveitar a coluna de C₁₈, material importado e caro. Nesse sentido após a eluição da toxina, a coluna foi lavada com clorofórmio e a seguir com hexano para remover as substâncias retidas sendo o C₁₈ recondicionado com acetona, antes de se aplicar uma nova amostra.

3.3.2 - Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel (MERCK, Alemanha) foi inicialmente realizada, testando-se as seguintes fases móveis:

- clorofórmio - acetona - isopropanol (87:10:3) (AOAC, 1990)
- clorofórmio-acetona (9:1) (ROMER, 1975)
- clorofórmio-acetona-metanol (90:10:2) (AOAC, 1990)
- éter etílico-metanol-água (95:4:1) (AOAC 1990)
- tolueno-acetato de etila - ácido fórmico (6:3:1) (SOARES & RODRIGUEZ- AMAYA, 1989)

O extrato seco da amostra foi dissolvido em 100 uL de benzeno-acetonitrila (9:1) sendo uma alíquota aplicada na camada juntamente com volumes conhecidos de padrão de AFM₁ (0,5 ug/mL). Após o desenvolvimento cromatográfico, a quantificação foi feita por comparação visual da intensidade de fluorescência da mancha

da amostra com as dos padrões, sob iluminação ultravioleta longa (365 nm).

Também foi realizado CCD bi-dimensional, usando-se inicialmente o solvente éter etílico-metanol-água (95:4:1) e posteriormente clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3).

A confirmação da AFM₁ foi feita por reação com TFA diretamente na camada, de acordo com a AOAC (1990).

3.3.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A AFM₁ foi extraída da amostra de leite em cartucho Sep-Pak de C₁₈ (WATERS), transferida com éter para uma coluna de sílica, eluída com diclorometano-etanol (95:5) e derivada com ácido trifluoroacético, de acordo com o método da AOAC, 1990 (proc. 986.16) (FIGURA 7).

A seguir a cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada utilizando-se os equipamentos e condições abaixo descritas:

- Cromatógrafo líquido marca VARIAN modelo 8500 com sistema de bombeamento de solvente adaptado com alça de amostra de 10 uL.
- detector por fluorescência VARIAN modelo 2070, excitação a 365 nm e com emissão a 410 nm.
- integrador VARIAN modelo 4290.

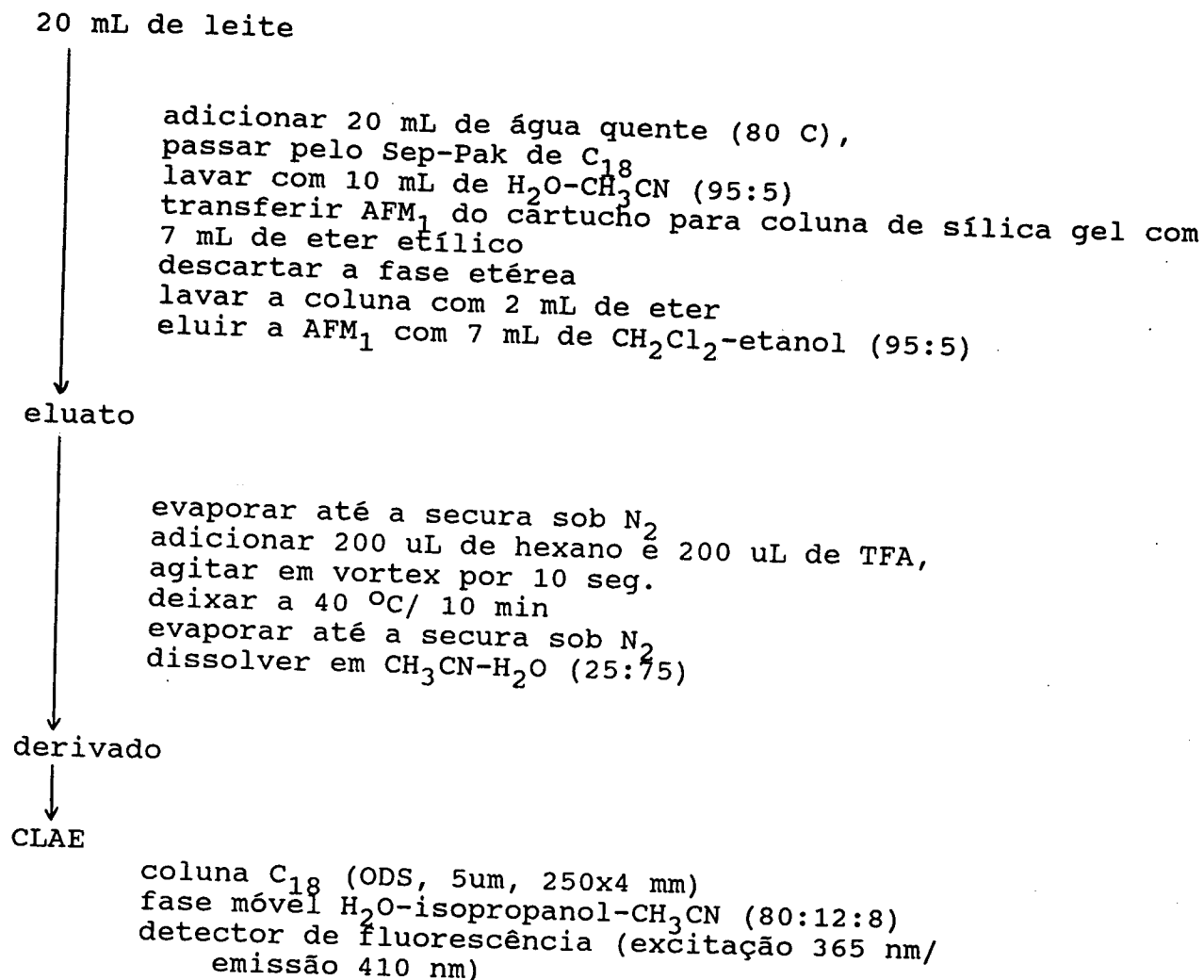


FIGURA 7- Esquema para extração de AFM₁ com Sep-pak de C₁₈,
proc. 986.16 da AOAC (1990).

- coluna LiChrospher 100 RP-18, 5 μ m (100 x 4,6 mm, Merck), precedida de coluna de guarda.
- fase móvel: água-isopropanol-acetonitrila (80:12:8).
- vazão de 0,5 mL/min.

A quantificação foi feita por padronização externa. Foi construída uma curva padrão com soluções contendo 4 , 8 , 16 e 32 ng de AFM₁ por mL de acetonitrila, que reagiram também com TFA e injetadas nas mesmas condições das amostras. A curva padrão (FIGURA 8) apresentou linearidade e passou pela origem, englobando as concentrações de AFM₁ encontradas nas amostras.

Os solventes empregados, marca LiChrosolv, foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração à vácuo, empregando-se membrana de 0,45 μ m e a seguir degaseificado por ultrassom. A água utilizada foi purificada por sistema de ultrafiltração Milli Q Plus (WATERS) e também degaseificada. As amostras e os padrões foram também filtrados em membrana (Millipore) de 0,45 μ m.

$$c = 8,92 \times 10^{-2} + 11,67 \times 10^{-2} a$$
$$r = 0,999$$

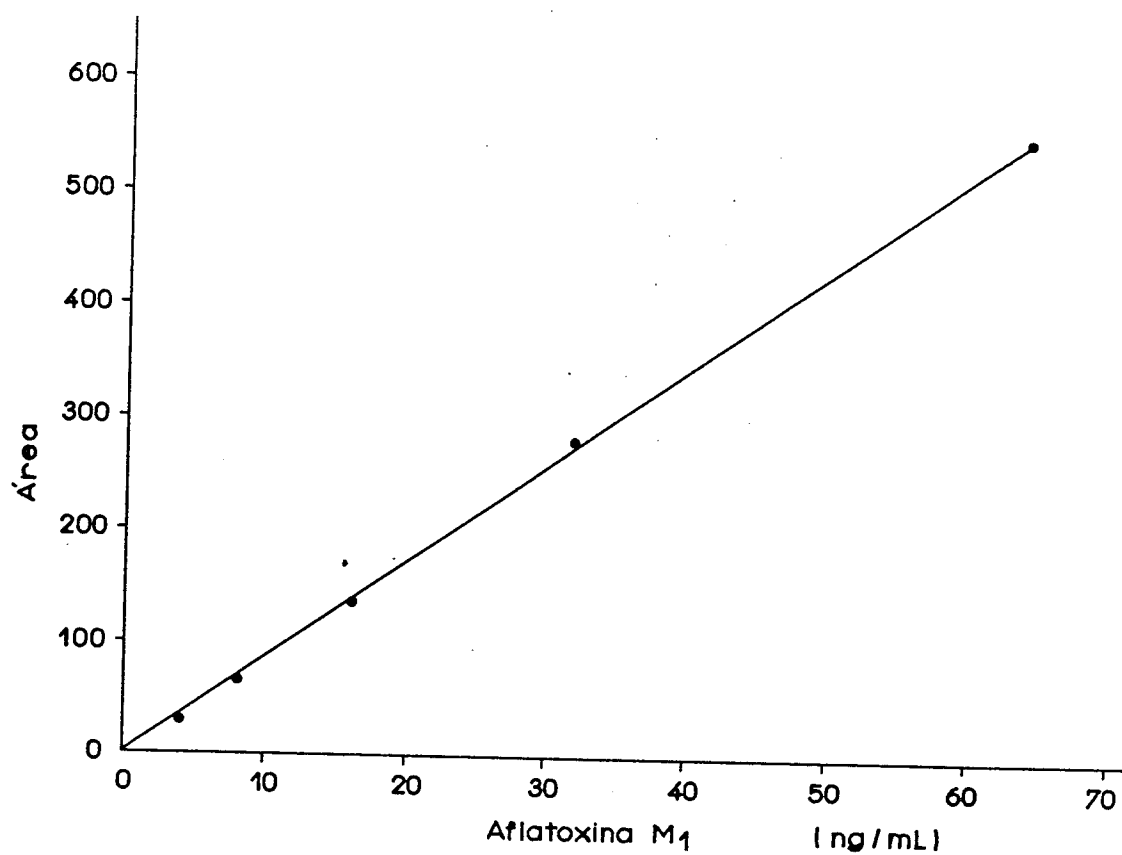


FIGURA 8- Curva padrão característica para aflatoxina M₁.

3.4- DETERMINAÇÃO DE PATULINA

Foram avaliados três diferentes métodos de determinação de patulina com amostras de suco de maçã artificialmente contaminadas com a toxina em vários níveis: o proc. 974.18 da AOAC (1990) modificado, o de SIRIWARDANA & LAFONT modificado (1979b) e o de MOLLER & JOSEFSSON (1980) (FIGURAS 9, 10 e 11).

O método da AOAC realiza três extrações sucessivas com 50 mL de acetato de etila, a seguir o extrato é concentrado e a limpeza é feita em coluna cromatográfica de sílica (FIGURA 9). O extrato, dissolvido em 100 mL da mistura acetato de etila-benzeno (25:75), é colocado na coluna e a patulina eluída com 200 mL da mesma mistura. O extrato é então evaporado até a secura em banho maria a 40 °C sob fluxo de nitrogênio, sendo sua quantificação efetuada por camada delgada. No presente trabalho esta etapa foi realizada por CLAE.

O procedimento de SIRIWARDANA & LAFONT utiliza extração com acetato de etila-isopropanol (4:6). A amostra é agitada com 50 mL do solvente por alguns minutos, adiciona-se então cloreto de sódio, agita-se novamente e recolhe-se a fase orgânica (FIGURA 10). A limpeza do extrato é feita em coluna cromatográfica de sílica de forma idêntica à descrita no método da AOAC (1990). A exemplo de aflatoxina M1, CLAE foi utilizada neste trabalho para quantificação em vez de CCD, utilizando as condições por nós estabelecidas.

Nestes dois primeiros métodos, a quantidade de amostra submetida à análise foi de 50 mL de suco.

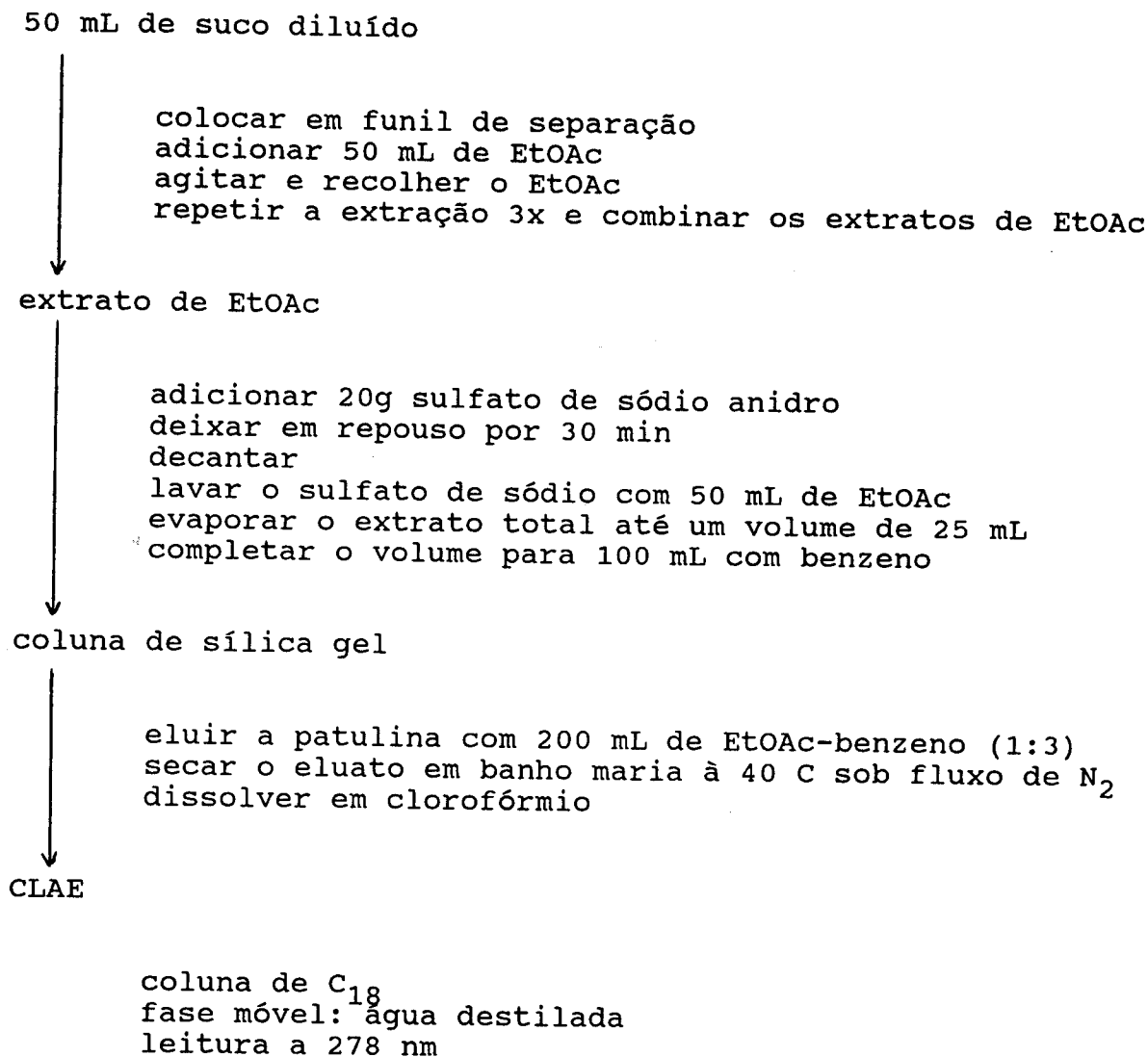


FIGURA 9 - Esquema para determinação de patulina, segundo o proc. 974.18, AOAC (1990) modificado.

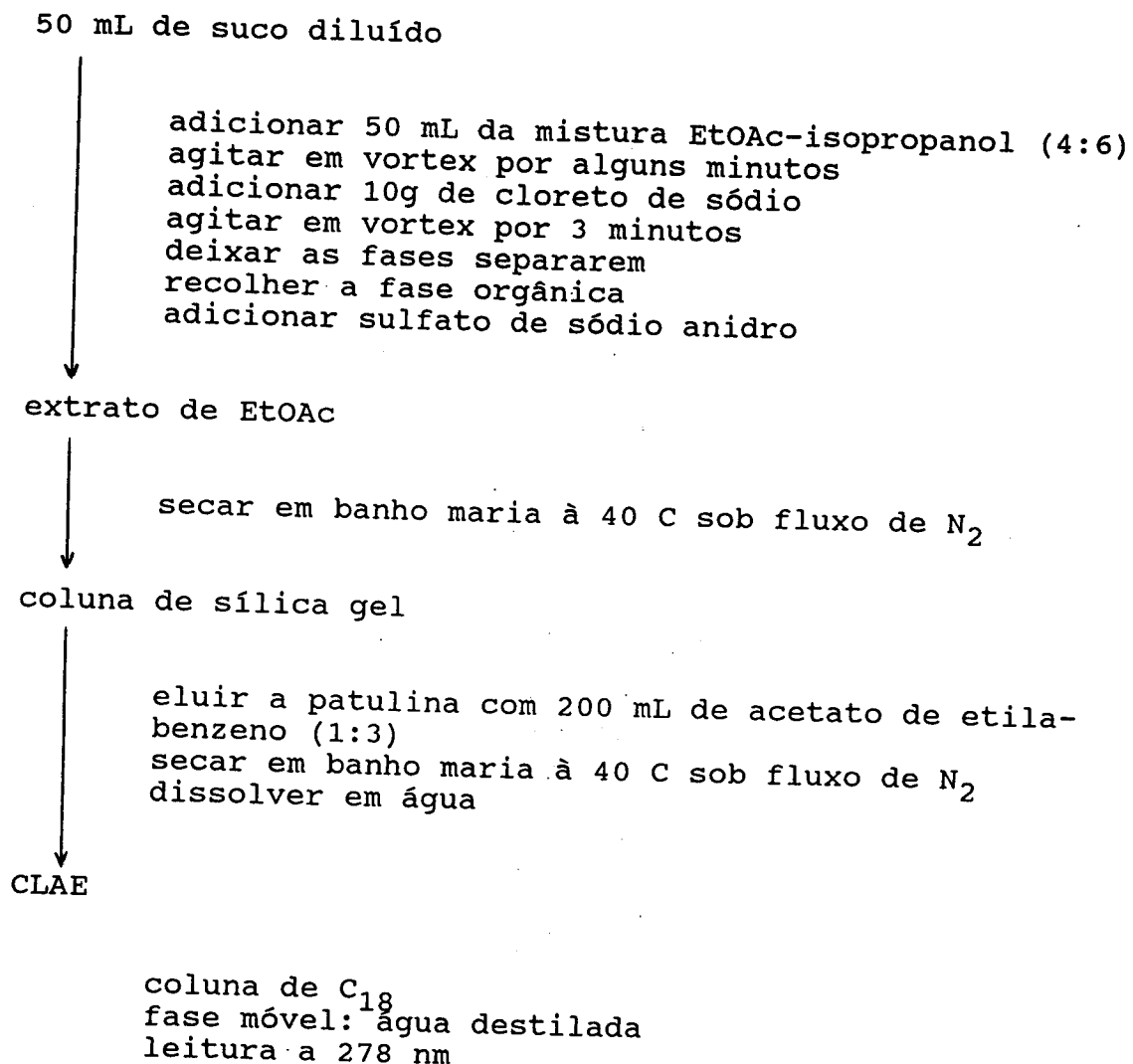


FIGURA 10 - Esquema para determinação de patulina, segundo procedimento de SIRIWARDANA & LAFONT (1979b) modificado.

5 mL de suco diluído

adicionar 5 ml de EtOAc
agitar por 2 minutos
deixar as fases separarem
recolher a fase orgânica
repetir a extração
combinar as fases orgânicas

extrato de EtOAc

adicionar 2mL de carbonato de sódio 1,5%
agitar por 1 minuto
recolher a fase orgânica
lavar a fase aquosa com 5 mL de EtOAc
juntar as fases orgânicas
secar em banho-maria à 40 C, sob fluxo de N₂
dissolver o extrato na fase móvel

CLAE

coluna de C₁₈
fase móvel: água destilada
leitura a 278 nm

FIGURA 11 - Esquema para determinação de patulina, segundo método de MOLLER & JOSEFSSON (1980).

O terceiro método, que utiliza apenas 5 mL de amostra e menor quantidade de acetato de etila, está esquematizado na Figura 11 (MOLLER & JOSEFSON, 1980). Para a remoção dos interferentes, utiliza-se a partição com carbonato de sódio 1,5%. A fase orgânica é recolhida, concentrada e a patulina quantificada por CLAE, empregando-se coluna C₁₈ Spherisorb, 5µm (250x3mm), água destilada como fase móvel e o pico da patulina é monitorado a 276 nm.

A quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada nas seguintes condições:

- Cromatógrafo líquido VARIAN modelo 9010 com sistema de bombeamento de solvente VARIAN, injetor Rheodyne com alça de amostra de 10 µl
- detector por arranjo de diodos (190 - 367 nm) VARIAN modelo 9065
- integrador VARIAN modelo 4400
- registrador HEWLETT-PACKARD modelo 2225D.
- coluna Spherisorb ODS-1, 5 µm (150x4,6 mm , ALLTECH), precedida de coluna de guarda de 3 cm de C-18 Micropak MACH-120, 10 µm.
- fase móvel: água destilada e tetrahidrofurano aquoso (1 a 5%)
- vazão: 1,2 mL/ min
- comprimento de onda: 278 nm

As amostras (ou padrões) foram filtradas através de uma membrana de 0,45 μ m (MILLIPORE) e a água destilada, obtida em sistema MILLI Q (MILLIPORE), antes de serem introduzidas no cromatógrafo.

Para a quantificação utilizou-se o método de padronização externa. Construiu-se uma curva padrão com concentrações de 0,20, 0,30, 0,60, 1,00 e 1,50 μ g de padrão por mL de água destilada, que foram injetadas nas mesmas condições das amostras. A curva padrão obtida apresentou linearidade, passou pela origem e englobou as concentrações das amostras (FIGURA 12).

A identidade da patulina foi confirmada pelo espectro de absorção UV (190 - 367 nm) obtido pelo detector por arranjos de diodos e por cromatografia em camada delgada, utilizando-se vários sistemas de solventes e o revelador MBTH 0,5% (cloreto de 5-metil-2-benzotiazolinona hidrazina) (REISS, 1973 ; AOAC, 1990) que permite a visualização da patulina sob iluminação ultravioleta a 365 nm (AOAC, 1990). Reações de acetilação e metilação também foram empregadas para confirmação em camada delgada.

As fases móveis utilizadas em CCD de sílica gel foram:

- tolueno-acetato de etila - ácido fórmico 90% (5:4:1) (AOAC, 1990)
- hexano-éter etílico anidro (1:3) (AOAC, 1990)
- clorofórmio-metanol (95:5) (AOAC, 1990)
- clorofórmio-acetona (9:1) (AOAC, 1990)
- clorofórmio-acetona-hexano (7:2:1)

$$c = 6,0 \times 10^{-3} + 2,0 \times 10^{-3} a$$
$$r = 0,998$$

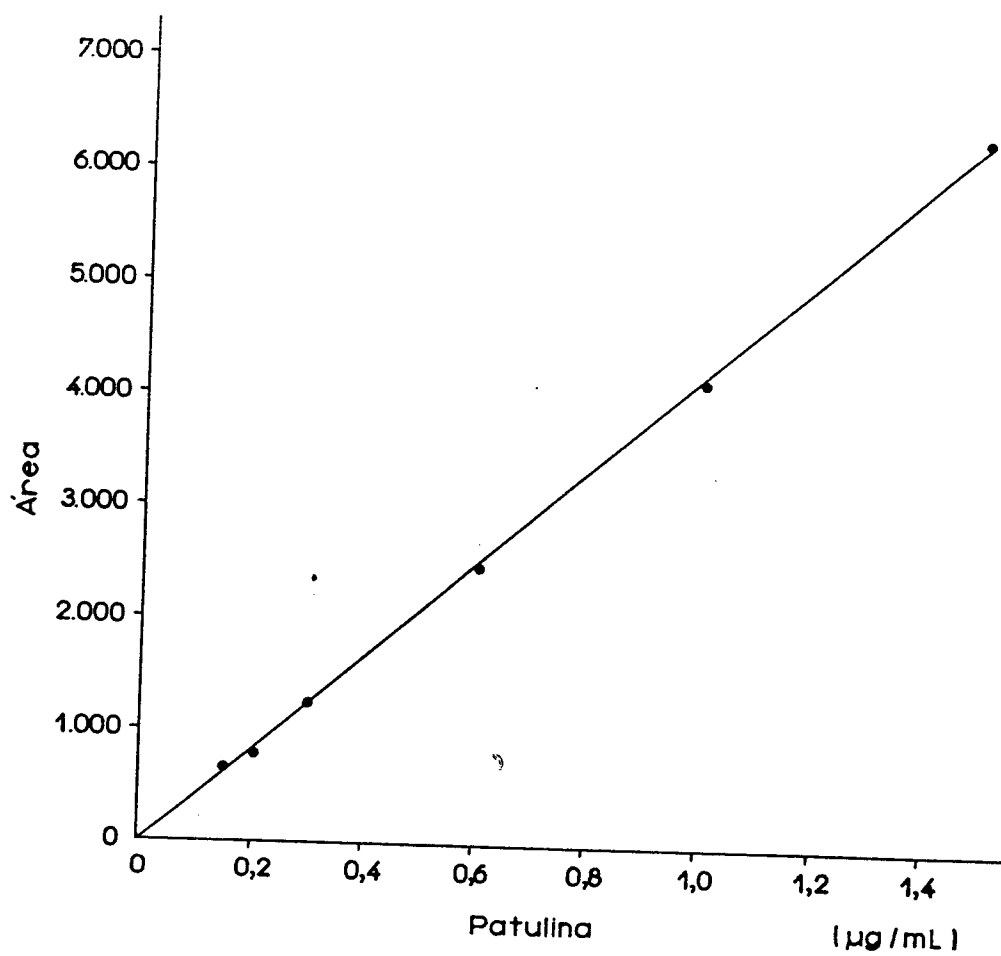


FIGURA 12- Curva padrão característica para patulina.

3.5- DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO

CICLOPIAZÔNICO

Dentre os poucos métodos existentes, foi escolhido o método de URANO et alii (1992a). O ácido ciclopiazônico foi extraído da amostra usando-se mistura metanol- NaHCO_3 2% (7:3). Após filtração, procedeu-se o desengorduramento com hexano, seguido de acidificação com 6N HCl e partição para clorofórmio (FIGURA 13).

A limpeza do extrato foi realizada por cromatografia em coluna de sílica. O extrato clorofórmico após concentração foi colocado na coluna de sílica gel que foi sucessivamente lavada pelos seguintes eluentes: éter etílico (10 mL), clorofórmio-acetona (1:1) (10 mL) e clorofórmio-metanol (95:5) (10 mL), que foram descartados. O ácido ciclopiazônico foi então eluído com mistura clorofórmio-metanol (3:1) (10 mL) e posteriormente evaporado a secura em banho-maria sob fluxo de nitrogênio. Sua determinação foi concluída através de cromatografia líquida de alta eficiência, realizada utilizando-se os seguintes equipamentos e condições:

- cromatógrafo líquido marca VARIAN modelo 9010 com sistema de bombeamento de solvente adaptado com alça de amostra de 20 μL .
- detector por arranjo de diodos (190-367 nm) VARIAN modelo 9065
- integrador VARIAN modelo 4400 e registrador HEWLETT-PACKAD modelo 2225D.
- coluna Spherisorb ODS-1, 5 μm (150 x 4,6mm, ALLTECH), precedida por coluna de guarda C_{18} Micropak MCH-120 de 10 μm e 3cm.

50 g de amostra

adicionar 200 mL de metanol - NaHCO_3 2% (7:3)
liquidificador por 3 min
filtrar

alíquota de 100 mL

adicionar 100 mL de hexano
agitar por 1 min e deixar as fases separarem
descartar o hexano
adicionar: 50 mL de KCl 10% e 2 mL de HCl 6N
extrair com 50 mL de CHCl_3 (2x)
agitar
combinar extratos de CHCl_3

extrato clorofórmico

evaporar a 40 C em evaporador rotatório

coluna de sílica

lavar a coluna com eter etílico, clorofórmio - acetona (1:1) e clorofórmio - metanol (95:5)
eluir o ácido ciclopiazônico com clorofórmio-metanol (3:1)
evaporar até a seca sob N_2
dissolver o extrato em metanol

CLAE

coluna C_{18}
fase móvel: metanol - água (85:15)
leitura a 282 nm

FIGURA 13- Esquema para determinação de ácido ciclopiazônico, segundo o método de URANO *et alii* (1992a).

- fases móveis: (A) metanol-água (85:15) e (B) metanol-água (85:15) contendo 4 mM de sulfato de zinco. Inicialmente 100% da fase A e após 10 min 100% da fase B, que permaneceu até 20 min, tempo total da corrida.

- vazão: 1,5 mL/min

O extrato seco foi diluído na fase móvel e então injetado no cromatógrafo empregando-se uma alça de 20 uL. Para a quantificação por padronização externa, construiu-se uma curva padrão com concentrações de 2,0 , 6,0 , 8,0 e 10,0 ug de padrão de ácido ciclopiazônico por mL de metanol-água (6:4) que foram injetadas nas mesmas condições das amostras. O pico do ácido ciclopiazônico foi monitorado a 282 nm. A exemplo das outras curvas de calibração, esta também apresentou linearidade, passou pela origem e abrangeu as concentrações das amostras (FIGURA 14).

A identificação foi feita por comparação com o tempo de retenção do padrão e complementado pelo espectro obtido pelo detector de arranjo de diodos. Foram realizadas também reações de derivação com borohidreto de sódio e 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Para corroborar a confirmação do ácido ciclopiazônico, foi utilizada também a cromatografia em camada delgada (CCD), com vários sistemas de solventes e reveladores para permitir sua visualização sob iluminação ultravioleta.

As fases móveis empregadas foram:

- acetato de etila - metanol - amônia (80:15:10)

$$c = 1,31 \times 10^{-2} + 0,12 \times 10^{-2} a$$
$$r = 0,997$$

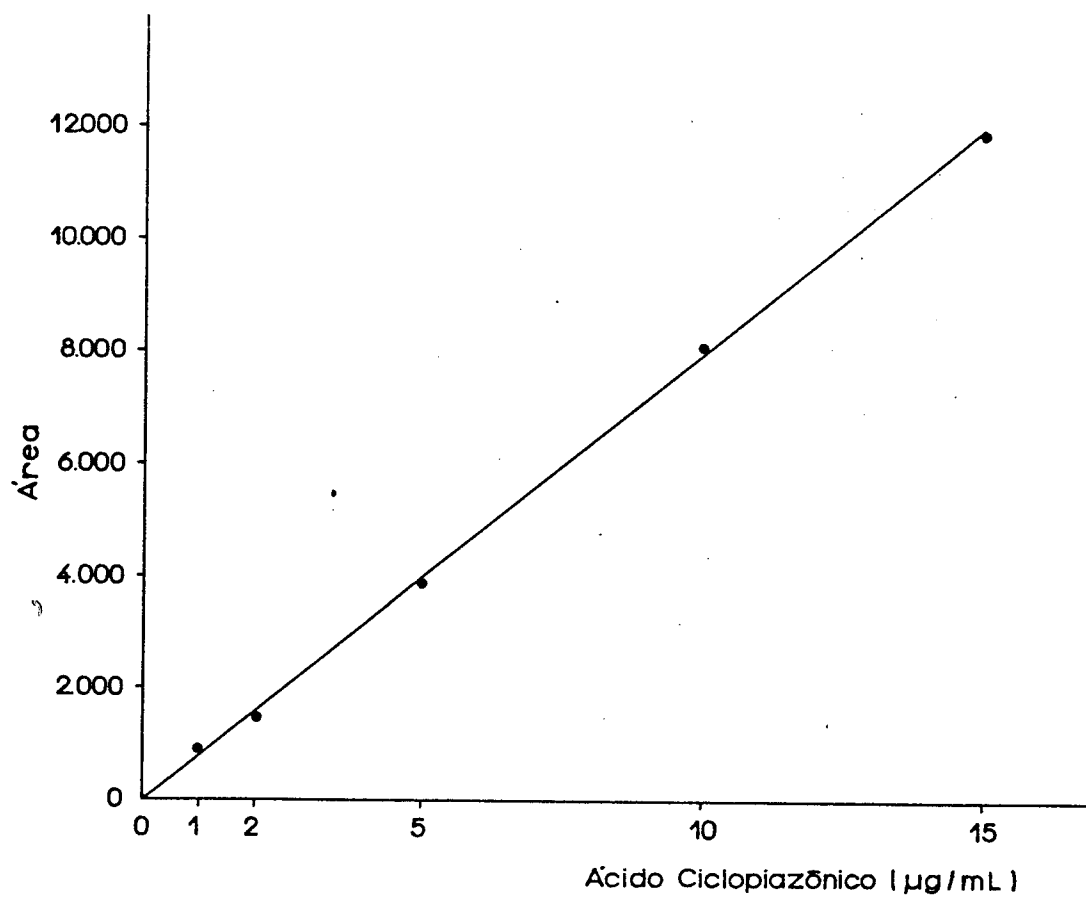


FIGURA 14- Curva padrão característica para ácido ciclopiazônico.

- benzeno-metanol-ácido acético (90:16:8)
- clorofórmio-metanol (98:2)
- clorofórmio-acetona (9:1)

Os reveladores foram:

- 0,5% de MBTH (5-metil-2-benzotiazolinona hidrazina)
- 1% de p-dimetilaminobenzaldeído em etanol
- 2,4DNP (2,4- dinitro fenil hidrazina) (1g + 7,5mL de ácido sulfúrico concentrado + 75mL de etanol + 170mL de água)

3.6- DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS

Para verificar a co-existência de ácido ciclopiazônico com aflatoxinas, as amostras de amendoim e milho foram também analisadas em relação a aflatoxinas, sendo utilizado o método proposto por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) que realiza a quantificação por CCD.

O método consiste na extração de aflatoxinas com metanol- 4% KCl (9:1), remoção de interferentes com solução de 10% sulfato de cobre (para amostras de amendoim) ou 30% de sulfato de amônia (para milho) e partição para clorofórmio. O extrato da amostra

após ser seco, é aplicado em camada delgada de sílica gel. O cromatograma foi desenvolvido com clorofórmio-acetona (9:1) e as aflatoxinas quantificadas por comparação visual da intensidade da fluorescência com quantidades conhecidas dos padrões aplicados na mesma placa.

A confirmação foi efetuada através de reação com TFA, realizada diretamente na placa (AOAC, 1990).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AFLATOXINA M₁

4.1.1- Estabelecimento do Método

Os limites estipulados para aflatoxina M₁ em alimentos são da ordem de ng/ L ou kg (ppt), níveis extremamente baixos que exigem dos métodos o máximo de sensibilidade e especificidade. Embora a amostragem não seja problema devido a distribuição uniforme dessa toxina nos alimentos, as etapas de extração e de remoção dos interferentes requerem muito cuidado. Tais problemas não são tão críticos nas metodologias de aflatoxinas B e G cujos limites permitidos estão na faixa de ug/ kg (ppb), sendo nesses casos a amostragem o principal desafio.

As características dos extratos de aflatoxina M₁, obtidos nas várias tentativas envolvendo a escolha do solvente extratante e a maneira de remover os interferentes, estão apresentados na TABELA 9.

Os procedimentos que utilizam metanol para extração proporcionaram certa dificuldade na filtração, prolongando-a e às vezes demandando centrifugação. Além disso, os vários clarificantes testados não se mostraram totalmente eficientes, resultando extratos ainda sujos que, quando aplicados em camada delgada, apresentavam mancha com caudas e interferentes, merecendo destaques uma substância amarela fluorescente e outra

TABELA 9- Características dos extratos obtidos das etapas de extração e limpeza para AFM₁.

Extração	Limpeza	Aparência do extrato final	Aparência na CD	
			cauda	interferentes fluorescentes
metanol puro/ ou metanol: NaCl 5% (9:1)	partição com hexano	sujo	sim	presente
	CuSO ₄ .5H ₂ O 10%	sujo	sim	presente
	FeCl ₃ / CuCO ₃	sujo	sim	presente
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 30%	sujo/ oleoso	sim	presente
	Pb(AcO) 20%	sujo	sim	presente
	ZnSO ₄ 15%	sujo/ oleoso	sim	presente
acetona pura/ ou acetona: água (85:15) ou acetona: NaCl 5% (9:1)	ZnAcO 15%/ NaCl 15%	sujo	sim	presente
	CuSO ₄ .5H ₂ O 10%	sujo/ oleoso	sim	presente
	FeCl ₃ / CuCO ₃	sujo	sim	presente
	Pb(AcO) 20%	sujo	sim	presente
	Pb(AcO) 20%/ hexano/ coluna de celulose	limpo	não	presente/ausente
	Pb(AcO) 20%/ hexano/ coluna de sílica	limpo	não	presente/ausente
	Zn(AcO) 15%	sujo/ oleoso	sim	presente
	ZnSO ₄ 15%	sujo/ oleoso	sim	presente
clorofórmio	coluna de sílica	limpo	não	ausente
	coluna C ₁₈	limpo	não	ausente
	partição com metanol/ partição com CCl ₄	limpo	não	ausente/presente
	partição com metanol/ partição com éter de petróleo	sujo	sim	presente
	partição com metanol/ partição com hexano	sujo	sim	presente
	partição com metanol/ partição com éter butílico	sujo	sim	presente

CD- camada delgada

verde azulada com Rfs muito próximos ao da toxina, que em muitos casos sobrepunha-se à toxina.

A tentativa de fazer a extração utilizando a mistura metanol-acetona (5:2) de acordo com o procedimento de DOMINGUEZ *et alii* (1987), não foi bem sucedida pois mesmo após centrifugação, as fases misturavam-se com facilidade na hora de recolher a fase desejada.

Os procedimentos que utilizam acetona como solvente extratante e sais como agentes clarificantes não mostraram-se eficientes na remoção dos interferentes. O extrato permaneceu sujo, a substância que apresentava fluorescência azul esverdeada e comportamento cromatográfico muito semelhante à AFM₁ não foi eliminada e as manchas apresentavam cauda (TABELA 9). O uso conjunto de acetato de chumbo, hexano e colunas cromatográficas de celulose e de sílica produziram extratos limpos, não apresentando na maioria das vezes caudas e interferentes fluorescentes na camada delgada.

A extração com clorofórmio juntamente com a limpeza em coluna de sílica resultaram em extrato não oleoso, livre de substâncias interferentes, que apresentava manchas simétricas na camada delgada.

O método desenvolvido por SERRALHEIRO & QUINTA (1985) que consiste na extração com clorofórmio, transferência para metanol, e limpeza por partição com tetracloreto de carbono revelou-se eficiente. As tentativas de substituir o tetracloreto de carbono, um dos solventes proibidos pelo "Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer" (AOAC, 1993), por éter butílico, éter de petróleo ou hexano não foram satisfatórias.

A utilização de coluna cromatográfica sozinha ou combinada com clarificantes também demonstrou-se eficiente, deixando o extrato limpo e eliminando a substância fluorescente que interferiria na visualização da AFM₁.

A coluna empacotada com C₁₈ (50 um) (fase reversa) foi testada na tentativa de substituir o cartucho de Sep-Pak. Nesse tipo de coluna, a AFM₁ eluiu antes dos interferentes, o oposto do que ocorre na coluna de sílica (fase normal). A limpeza foi eficiente, a mancha de AFM₁ na camada sendo simétrica e livre de interferentes.

A reutilização do adsorvente C₁₈ foi realizada oito vezes com amostras de leite pasteurizado (TABELA 10), mas a coluna foi acumulando sujeira, tornando o fluxo cada vez mais lento e conseqüentemente dificultando o seu aproveitamento.

Para a coluna de sílica o eluente que apresentou melhor recuperação foi 60 mL de clorofórmio-acetona (3:2) (em lugar de 40 mL de clorofórmio-acetona (4:1)). Já no caso da celulose, foi necessário substituir o clorofórmio-hexano (1:1) por clorofórmio-hexano-acetona (5:4:1).

Dentre as técnicas de limpeza testadas as que apresentaram melhores resultados foram:

- acetato de chumbo/coluna de celulose
- acetato de chumbo/coluna de sílica
- coluna de sílica
- tetracloreto de carbono
- coluna de C₁₈

TABELA 10 - Porcentagens de recuperação obtidas da reutilização da coluna de C₁₈.

Reutilização	Teor de AFM ₁ adicionado (ng/ L)	Teor de AFM ₁ recuperado (ng/ L)	Recuperação (%)
1	500	415	83,0
2	400	350	87,7
3	200	179	89,8
4	200	153	76,6
5	250	226	90,4
6	250	219	87,6
7	200	155	77,6
8	300	245	81,7

E dentre as misturas de solventes utilizadas para CCD as que promoveram as melhores separações entre AFM_1 e as outras substâncias foram clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3) e éter etílico-metanol-água (95:4:1) (FIGURA 15). O desempenho do éter etílico, no entanto, variou de uma marca para outra.

Devido ao fato de se trabalhar com ng/L a sensibilidade requerida é muito alta, não sendo possível utilizar placas cromatográficas preparadas em laboratório. O limite de detecção obtido utilizando-se placas preparadas foi de 2,5 ng de AFM_1 , enquanto que no caso das placas compradas, chegou a 0,5 ng.

Na tentativa de se melhorar a separação entre AFM_1 e os interferentes utilizou-se a técnica do multidesenvolvimento, empregando-se primeiramente a fase móvel clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3) e a seguir éter etílico-metanol-água (95:4:1). Pela FIGURA 15 observa-se que no caso das amostras de leite obteve-se boa separação, mas não melhor que a obtida com o desenvolvimento unidimensional utilizando-se apenas um dos solventes.

Para amostras de queijo, a utilização da CCD unidimensional mesmo com multidesenvolvimento, não revelou-se eficiente na separação da AFM_1 dos interferentes, sendo necessário empregar a CCD bi-dimensional. Usou-se primeiramente éter etílico-metanol-água (95:4:1), seguido por clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3). Esse procedimento é muito dispendioso pois só permite a quantificação de uma amostra cada vez (FIGURA 16).

Após todas as tentativas feitas, conclui-se que para a remoção efetiva dos interferentes era necessário o uso de coluna cromatográfica. Ao contrário das aflatoxinas B e G para as quais a limpeza fácil e rápida utilizando metais pesados tem sido bem

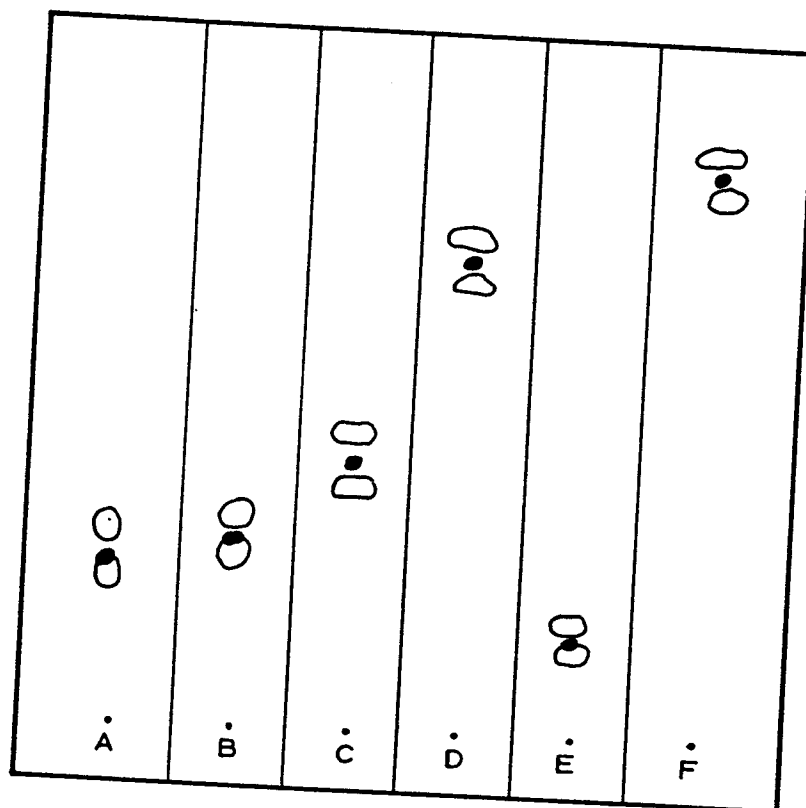


FIGURA 15- Aspecto do cromatograma (em placa de sílica) dos extratos provenientes de amostras de leite obtido pelo proc. 980.21 (AOAC, 1990). Fases móveis testadas: clorofórmio-acetona-metanol (90:10:2) (A); clorofórmio-acetona (9:1) (B); clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3) (C); éter etílico-metanol-água (95:4:1) (D); tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (6:3:1) (E); multidesenvolvimento (C, depois D) (F). Aflatoxina M_1 representada pela mancha sólida.

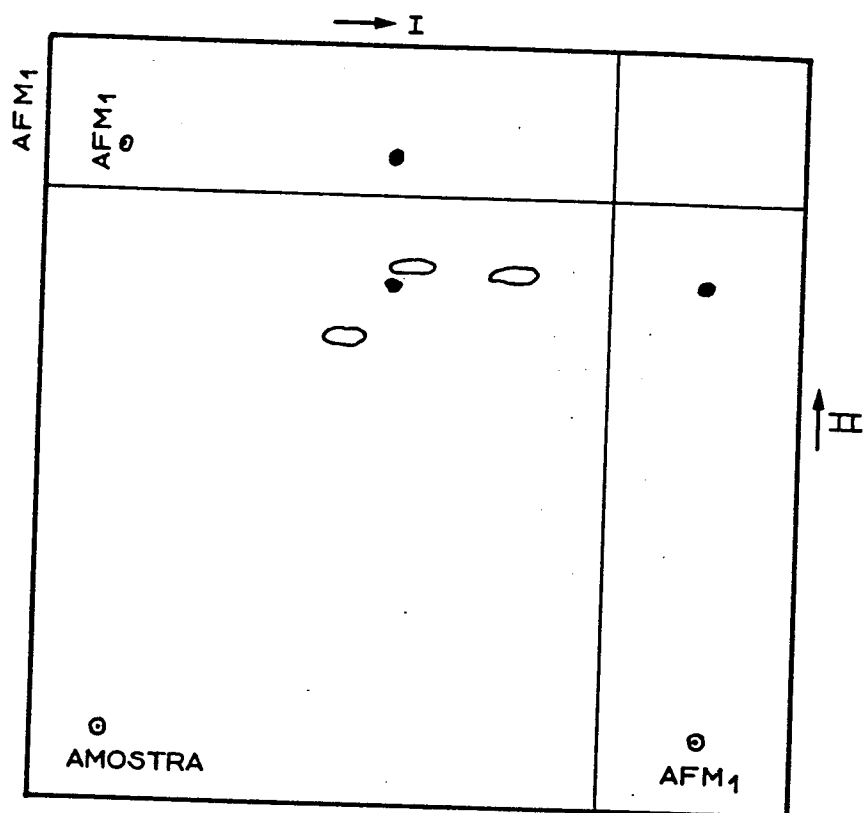


FIGURA 16- Cromatograma obtido de amostra de queijo por CCD-bidimensional desenvolvido com clorofórmio - acetona - isopropanol (87: 10: 3) (I) e éter etílico - metanol - água (95: 4: 1) (II). Aflatoxina M₁ representada pela mancha sólida.

sucedida, nenhum dos sais testados mostrou-se capaz de eliminar os interferentes de AFM₁.

A limpeza por cromatografia em coluna (geralmente sílica), apesar de ser parte de numerosos métodos para micotoxinas, é uma técnica trabalhosa e demorada, requerendo grandes volumes de solventes para eluir separadamente os interferentes e as toxinas. Além disso, a separação efetiva dos interferentes das toxinas depende da capacidade de adsorção da fase estacionária e do poder de eluição dos solventes que devem ser equivalentes aos existentes quando o método foi desenvolvido. A reconhecida variação das propriedades dos adsorventes e da pureza dos solventes de uma marca para outra, ou até de um lote para outro da mesma marca, torna necessária a realização de testes preliminares para cada remessa recebida, sob pena de obter-se resultados totalmente errôneos. No presente trabalho, por exemplo, para se garantir a eluição total de AFM₁ o volume de solvente clorofórmio-acetona (1:4) foi aumentado de 40 para 60 mL.

Utilizando-se os três tipos de adsorventes, foram testadas a recuperação nas colunas, adicionando-se quantidades conhecidas de padrão às mesmas. A coluna de C₁₈ revelou-se melhor enquanto a de celulose foi a que mostrou menor recuperação (TABELA 11).

Na TABELA 12 estão expressos os valores de recuperação da AFM₁ adicionada ao leite pasteurizado, comparando-se três métodos que utilizam coluna cromatográfica para limpeza e o método que emprega tetracloreto de carbono (SERRALHEIRO & QUINTA, 1985).

O método que utiliza coluna de C₁₈ foi o que apresentou a melhor recuperação da toxina, seguido de perto pelo que utiliza coluna de sílica. As porcentagens de recuperação situam-se dentro da faixa considerada aceitável para aflatoxina M₁ (SCOTT, 1989),

TABELA 11 - Recuperação de AFM₁ adicionada na coluna.

quantidade adicionada (ng/ L)	No. de repetições	Recuperação média (%)		
		coluna de sílica ^a	coluna de celulose ^b	coluna de C ₁₈ ^c
200	3	81,2	79,3	82,8
300	3	83,1	78,5	85,2
400	3	84,2	79,5	85,5

a eluída por acetona clorofórmio (3:2)

b eluída por hexano - clorofórmio (1:1)

c eluída por acetona pura

TABELA 12 - Recuperação de AFM₁ no método completo.

Quantidade adicionada (ng/L)	Recuperação média (%) (No. de repetições entre parenteses)			
	Coluna de sílica ^a	Coluna de celulose ^b	Coluna de C ₁₈ ^c	CCl ₄ ^d
200	77,4 (3)	74,4 (3)	82,9 (3)	77,6 (2)
250	78,2 (3)	61,1 (3)	79,6 (2)	67,7 (2)
300	80,4 (3)	72,0 (3)	84,7 (2)	-

^a proc. 980.21 da AOAC (1990)

^b proc. 974.17 da AOAC (1990)

^c proc. 980.21 da AOAC (1990)

^d método de SERRALHEIRO & QUINTA (1985)

especialmente considerando-se que os níveis testados estão baixos, e próximos do limite de detecção do método.

Tendo em vista os resultados obtidos, foi descartado o uso da coluna de celulose que além de utilizar grandes quantidades de adsorvente e de eluentes, revelou-se menos eficiente do que a coluna de sílica.

A coluna C_{18} é uma boa alternativa, mas por ser um material caro e de difícil aquisição e considerando-se ainda que a diferença entre os resultados obtidos pela colunas de sílica e de C_{18} não foi significativa, foi tomada a decisão de se fazer o levantamento da incidência de AFM_1 pelo método da AOAC, 1990 (proc. 980.21), que tem ainda a vantagem adicional de ser um método oficial. Este método consiste na extração com clorofórmio, limpeza em coluna de sílica, e quantificação por CCD, unidimensional para leite e bi-dimensional para queijo e iogurte.

4.1.2- Incidência de aflatoxina M_1 em leite e derivados

Foram analisadas 35 amostras de leite em pó (20 de leite integral e 15 de leite desnatado), 103 amostras de leite pasteurizado (20 amostras do tipo A, 36 do tipo B e 47 do tipo C), 36 amostras de queijo (12 amostras do tipo minas, 12 do tipo mozzarella e 12 do tipo prato) e 30 de iogurte (15 amostras de sabor natural e 15 de sabor morango). Do total de 204 amostras analisadas, detectou-se AFM_1 em apenas 4 amostras (TABELA 13). A concentração de AFM_1 nas amostras positivas variou de 73 a

TABELA 13- Incidência de aflatoxina M₁ em leite e derivados.

Produto	Ano	Método ^a	No. de marcas	No. de amostras analisadas	No. de amostras positivas
leite em pó integral	1989	AOAC/CCD	3	20	0
leite em pó desnatado	1989	AOAC/CCD	3	15	0
leite pasteurizado					
- tipo A	1989	AOAC/CCD	2	8	0
- tipo B	1989	AOAC/CCD	3	18	0
- tipo C	1989	AOAC/CCD	5	25	0
queijo					
- tipo minas	1990	AOAC/CCD	3	12	0
- tipo mozzarella	1990	AOAC/CCD	3	12	0
- tipo prato	1990	AOAC/CCD	3	12	0
iogurte					
- natural	1990	AOAC/CCD	4	15	0
- sabor morango	1990	AOAC/CCD	4	15	0
leite pasteurizado					
- tipo A	1992	AOAC/CLAE	3	12	0
- tipo B	1992	AOAC/CLAE	4	18	2
- tipo C	1992	AOAC/CLAE	5	22	2
Total				204	4

^a O limite de detecção do método CCD (proc. 980.21, AOAC 1990) é 150 ppt para leite e 300 ppt para leite em pó, queijo e iogurte e do método por CLAE, 20 ppt. As análises foram realizadas em duplicatas.

370 ng/ L (TABELA 14). Se fosse aplicado o limite de tolerância em vigor nos Estados Unidos, nenhuma destas amostras seria rejeitada, estando todas abaixo de 500 ng/ L. Pela legislação suíça, no entanto, as quatro amostras positivas seriam rejeitadas por terem superado o limite de 50 ng/ L para leite.

Os resultados obtidos indicam que houve incidência de AFM_1 em leite e derivados de leite comercializados na cidade de Campinas neste período. No entanto, esse levantamento deve ser continuado por alguns anos para poder ter-se uma avaliação mais segura. De qualquer forma, a monitoração de micotoxinas deve ser uma atividade continua já que as condições favoráveis ou desfavoráveis à formação de toxinas podem mudar de um período para outro.

As amostras foram analisadas por CCD em 1989 e 1990. No ano de 1992 foi utilizada a CLAE com detector de fluorescência. Os cromatogramas obtidos (FIGURA 17) demonstraram a alta seletividade do método por CLAE, principalmente devido ao derivado formado pela reação com TFA, a eficiente remoção dos interferentes e ao uso do detector por fluorescência. Este método também apresentou maiores taxas de recuperação, como mostra a TABELA 15.

Cabe salientar o fato de amostras positivas terem aparecido somente quando se utilizou a CLAE com detector de fluorescência. De fato esta técnica apresenta um limite de detecção bastante menor (25 ng/L) que o obtido com CCD (150 ng/L) para leite. Das quatro amostras positivas apenas uma poderia ter sido detectada e quantificada também por CCD, a amostra com 370 ng/ L, as demais amostras apresentaram níveis (73 a 95 ng/ L) abaixo do limite de detecção da CCD. A continuação da monitoração de AFM_1 deve ser realizada preferencialmente por CLAE.

TABELA 14 - Teores de aflatoxina M₁ nas amostras positivas de leite pasteurizado.

Produto (leite pasteurizado)	Teor de AFM ₁ (ng/L)
tipo B	95
tipo B	73
tipo C	370
tipo C	85

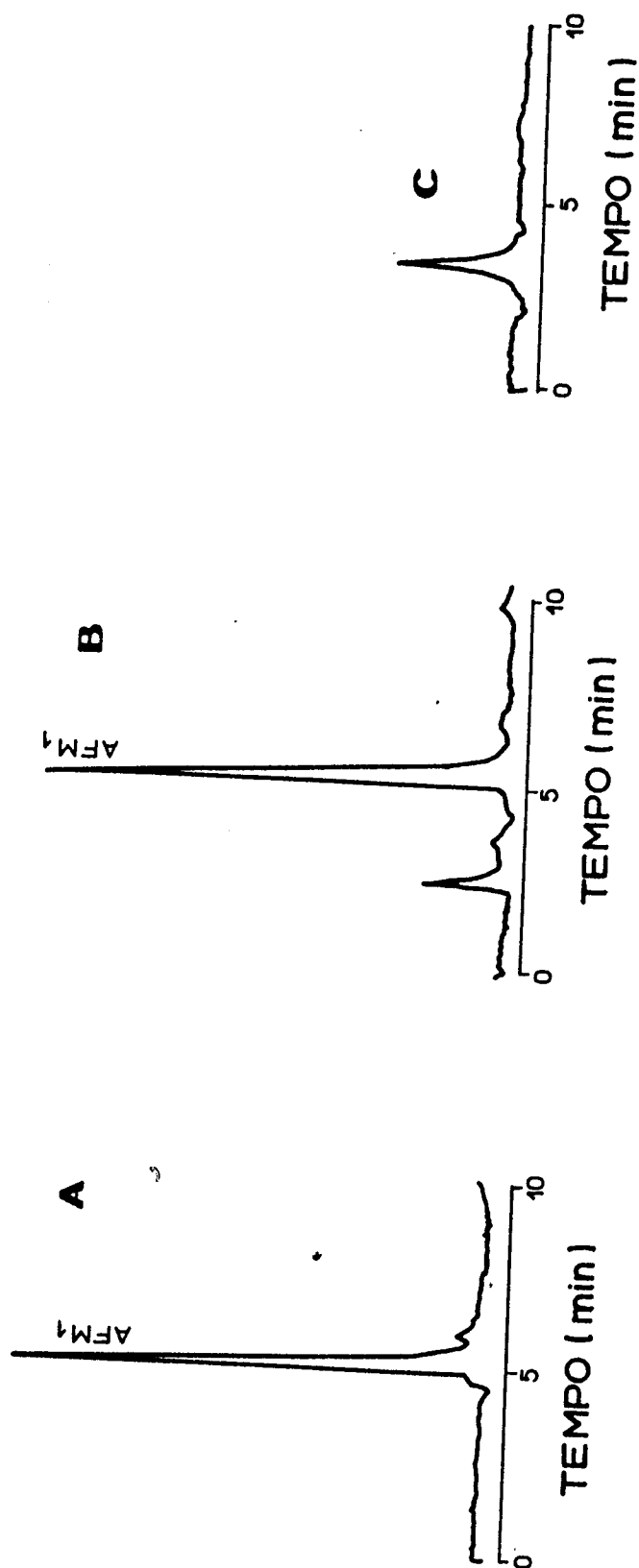


FIGURA 17 - Cromatogramas característicos de um padrão de AFM_1 , derivado com TFA (A); de uma amostra de leite contaminada, derivada com TFA (B) e de uma amostra de leite não contaminada, derivada com TFA (C). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 μ m, (100 x 4,6 mm), fase móvel água/isopropanol/acetônitrila (80:12:8); vazão 0,5 mL/min; detector por fluorescência, excitação a 365 nm e emissão a 410 nm.

TABELA 15 - Porcentagens de recuperação de AFM₁ em leite pelo método por CLAE.

Quantidade adicionada (ng/L)	Recuperação média (%)	Desvio padrão
100	90,5	9,2
150	91,2	8,9

Cabe ainda ressaltar, a título de comparação, que a evidente superioridade da CLAE para determinação de AFM_1 não se confirma no caso de aflatoxinas B e G para as quais a CCD tem se mostrado perfeitamente adequada.

4.2- PATULINA

4.2.1- Estabelecimento do Método

Embora exista um método oficial da AOAC (1990) para determinação de patulina em camada delgada, esta toxina, não sendo fluorescente, é dificilmente quantificada por CCD e vários autores consideram tal quantificação apenas semi-quantitativa (WARE et alli, 1974; STRAY, 1978; FORBITO & BABSKY, 1985). Portanto, somente foram estudados neste trabalho, métodos que utilizam a CLAE .

Dos três métodos avaliados, o de MOLLER & JOSEFSSON (1980) foi o que forneceu o melhor extrato para CLAE, resultando na separação de um pico da patulina livre de interferentes.

O método da AOAC (1990) modificado, requer grande volume de solventes e um tempo maior de análise. O cromatograma obtido por este método está representado na FIGURA 18. A tentativa de se injetar o extrato obtido por este procedimento, sem a etapa de limpeza em coluna de sílica, demonstrou-se inviável; o



FIGURA 18- Cromatograma obtido pelo método da AOAC (1990). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 μ m, (150x4,6mm); fase móvel: THF 3% aquoso; vazão de 1,0 mL/min; detector por arranjo de diodos a 278 nm.

cromatograma mostrou que substâncias interferentes eluíram praticamente juntos com a patulina (FIGURA 19).

O cromatograma do extrato obtido pelo método de SIRIWARDANA & LAFONT (1979) modificado, também apresentou sobreposição dos picos de patulina e interferentes (FIGURA 20).

O método de MOLLER & JOSEFSSON (1980), além de exigir pequenas quantidades de solvente e de amostra, forneceu um cromatograma melhor, com o pico de patulina livre de interferentes (FIGURA 21), apesar da limpeza ter-se constituído apenas de partição com solução de carbonato de cálcio e não ter sido utilizada a cromatografia em coluna de sílica gel como no método da AOAC.

Amostras de suco de maçã artificialmente contaminadas com patulina foram quantificadas pelos três métodos e as porcentagens de recuperação conseguidas estão na TABELA 16. O método de MOLLER & JOSEFSSON foi o que apresentou as maiores taxas de recuperação.

Utilizando-se o método acima, foi realizado um teste de recuperação em sucos de maçã artificialmente contaminados com patulina em 5 níveis de contaminação. Os resultados obtidos mostraram recuperações acima de 82% (TABELA 17), equivalentes as maiores recuperações citadas na literatura (SCOTT, 1974 ; WARE et alii, 1974 ; KUBACKI & GOSZCS, 1988 ; HUNT et alii, 1978 ; MOLLER & JOSEFSSON, 1980 ; STRAY, 1978 ; FORBITO & BABSKY, 1985). Este foi então o método escolhido para a determinação de patulina em sucos de frutas. O limite de detecção obtido pelo método foi de 8 ug/ L ou kg.

Na literatura, os trabalhos sobre a determinação de patulina por CLAE mostraram ser a água destilada uma boa fase móvel para a separação dos interferentes da patulina. FORBITO & BABSKY

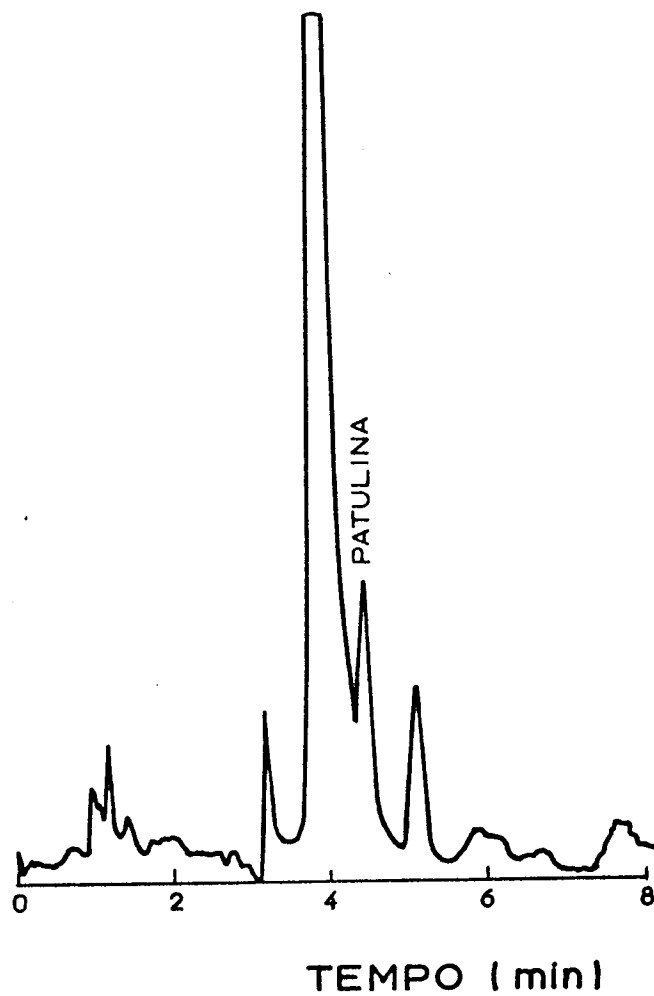


FIGURA 19- Cromatograma obtido pelo método da AOAC modificado (1990). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 μ m, (150x4,6mm); fase móvel: THF 3% aquoso; vazão de 1,0 mL/min; detector por arranjo de diodos a 278 nm.

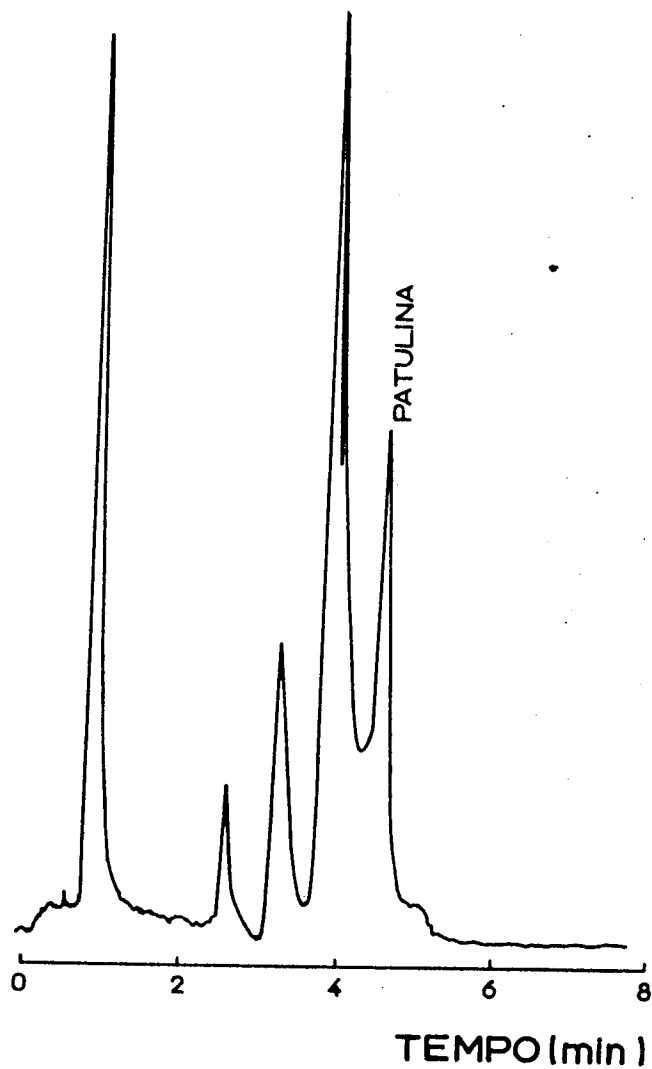


FIGURA 20- Cromatograma obtido pelo método de SIRIWARDANA & LAFONT. Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 μ m, (150x4,6mm); fase móvel: THF 3% aquoso; vazão de 1,0 mL/min; detector por arranjo de diodos a 278 nm.

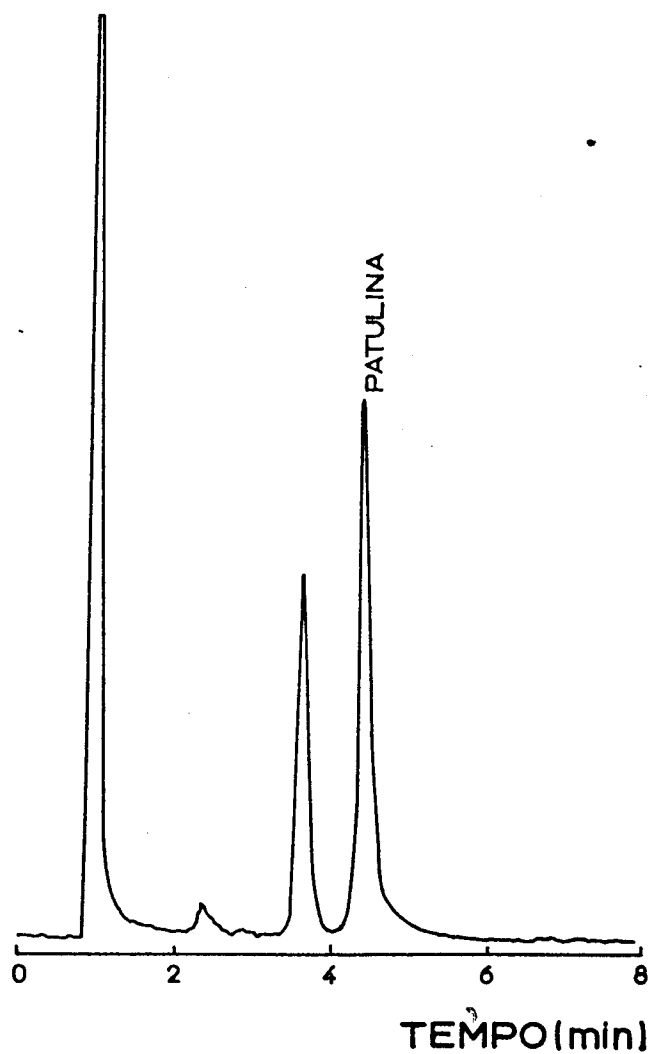


FIGURA 21- Cromatograma obtido pelo método de MOLLER & JOSEFSON. Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 μ m, (150x4,6mm); fase móvel: THF 3% aquoso; vazão de 1,0 mL/min; detector por arranjo de diodos a 278 nm.

TABELA 16- Porcentagens de recuperação da patulina adicionada ao suco de maçã obtidas pelos três métodos avaliados.

Quantidade adicionada (ug/L)	Recuperação (%)		
	proc. 974.18 AOAC (1990)	SIRIWARDANA & LAFONT (1979)	MOLLER & JOSEFSSON (1980)
30	85,5	82,5	87,3
50	87,8	84,3	90,2

As análises foram realizadas em triplicata.

TABELA 17- Recuperação da patulina adicionada ao suco de maçã.
pelo método de MOLLER & JOSEFSSON (1980)

Quantidade adicionada (ug/L)	Recuperação (%)	
	média ^a	DP
30	85,8	8,3
40	87,3	3,4
70	101,5	3,3
80	90,7	6,8
120	95,2	6,5

DP- desvio padrão

^a os valores são médias de 3 repetições em duplicatas para cada nível

(1985) obtiveram bons resultados usando 0,8% de tetrahydrofurano (THF) aquoso como fase móvel com vazão de 1,0 mL/min. A introdução de pequenas quantidades de THF reduziu o tempo de retenção da patulina. No presente trabalho, com 1 , 2 , 3 e 5% de THF aquoso e vazão de 1,0 mL/min , o tempo caiu para 7,2 , 6,4 , 5,8 e 4,6 min, respectivamente. Esta redução não prejudicou a análise, uma vez que não haviam picos próximos do da patulina. A injeção de amostras artificialmente contaminadas indicou que a vazão de 1,0 mL/min com 3% de THF era o melhor.

O tempo de retenção com água pura como fase móvel foi de 10,5 min, no entanto optou-se pelo seu uso da água em função do alto custo do THF e da sua tendência de acumular peróxidos.

Na FIGURA 22 estão representados os cromatogramas característicos do padrão de patulina e de uma amostra de suco de maçã não contaminado e na FIGURA 23 os cromatogramas de uma amostra de suco de maçã contaminado e de uma amostra de maçã deteriorada. Observa-se que nos cromatogramas correspondentes às amostras, o pico da patulina está bem separado dos picos dos interferentes.

A identidade da patulina encontrada nas amostras foi inicialmente demonstrada pela semelhança do seu espectro de absorvância com o de padrão, obtido pelo detector por arranjo de diodos (FIGURA 24). Além disso, o pico da patulina no cromatograma de CLAE desapareceu com o tratamento com anidrido acético/piridina (FIGURA 25). O fato de não haver aparecido outro pico correspondente ao produto formado provavelmente deveu-se à diminuição substancial de polaridade com a reação. Em camada delgada de sílica gel a patulina da amostra positiva de suco de maçã e das maçãs estragadas apresentaram uma mancha amarela após

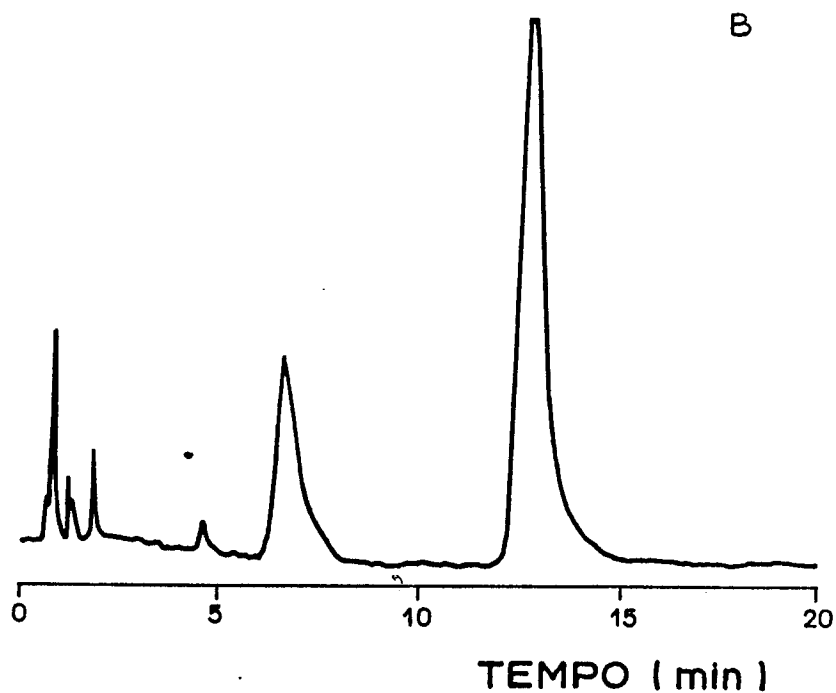
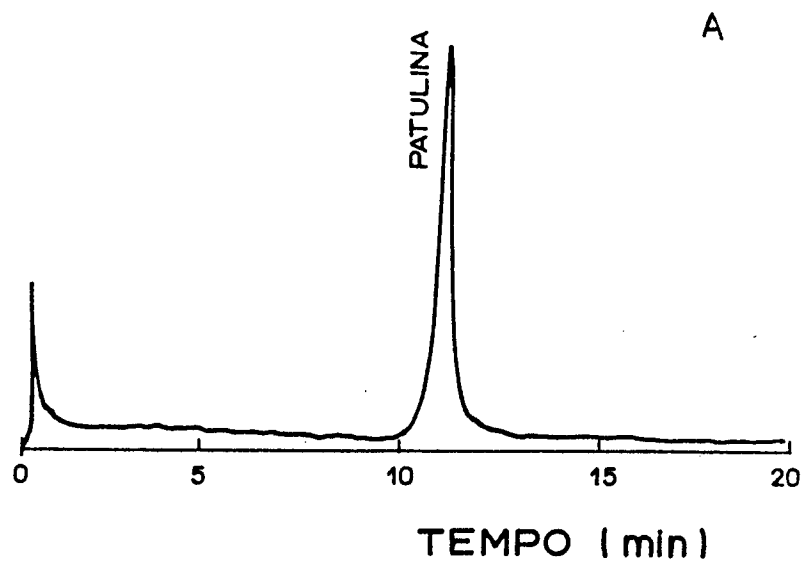


FIGURA 22- Cromatograma característico de um padrão de patulina (A) e de um suco de maçã não contaminado (B). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 μ m, (150x4,6mm); fase móvel: água destilada; vazão de 1,2 mL/min; detector por arranjo de diodos a 278 nm.

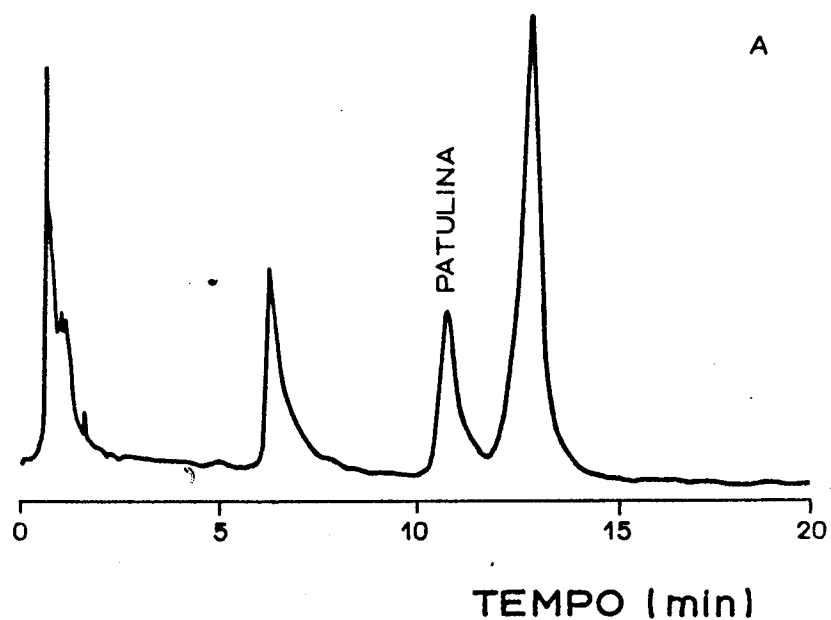
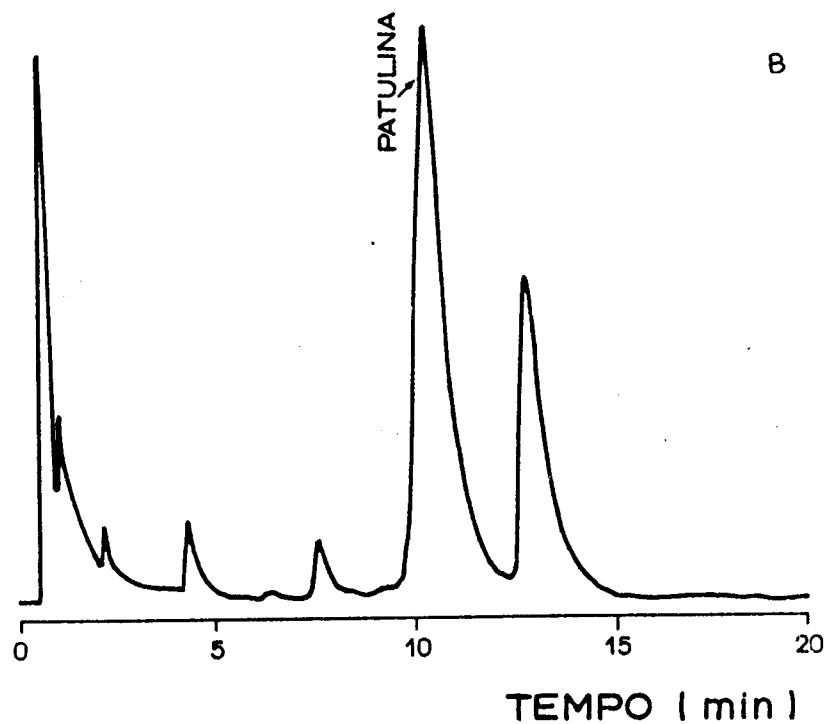


FIGURA 23- Cromatograma característico de uma amostra de suco de maçã contaminada (A) e de uma amostras de maçã deteriorada (B). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 μ m, (150x4,6mm); fase móvel: água destilada; vazão de 1,2 mL/min; detector por arranjo de diodos a 278 nm.

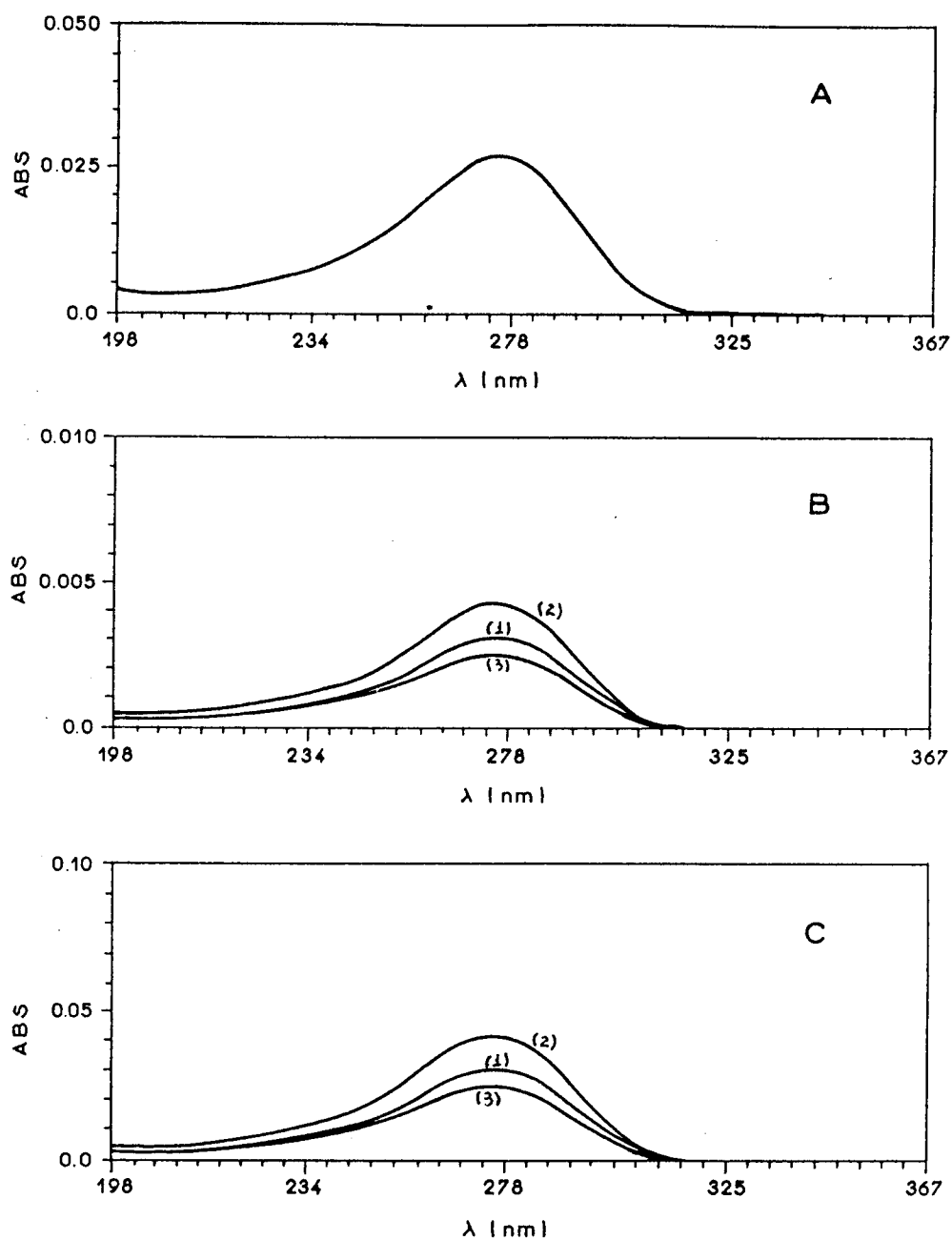


FIGURA 24- Confirmação e teste de pureza - espectros de absorvância característicos de padrão de patulina (A), amostra de suco de maçã contaminada (B) e maçã estragada (C), obtido pelo detector por arranjo de diodos, para os dois últimos no início (1), máximo (2) e fim (3) do pico.

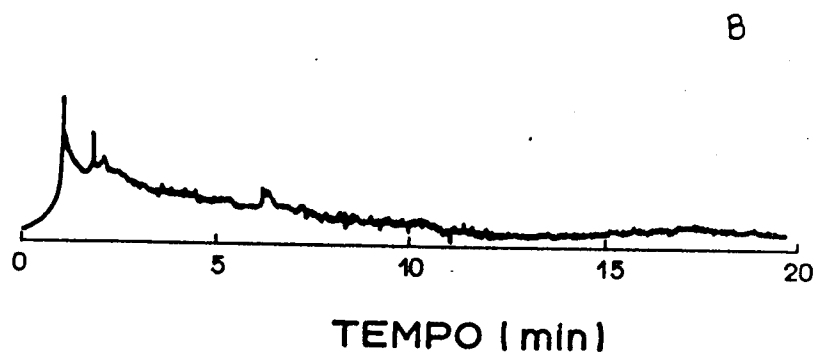
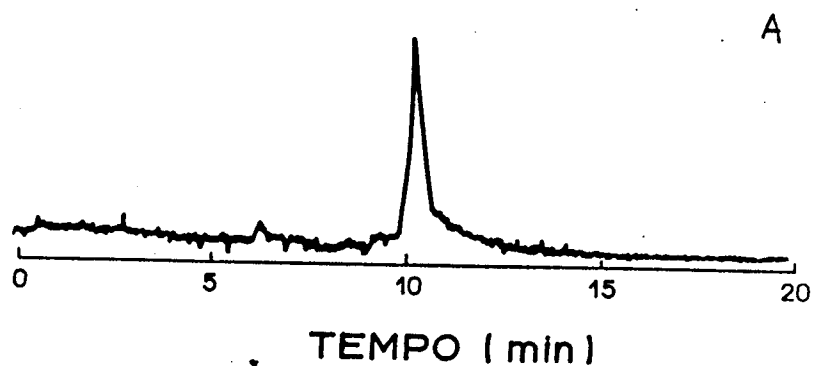


FIGURA 25- Cromatogramas característicos de uma amostra não acetilada de suco de maçã contaminado (A) e de uma amostra acetilada de suco de maçã contaminado (B). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 μ m, (150x4,6mm); fase móvel: água destilada; vazão de 1,2 mL/min; detector de arranjo por diodos a 278 nm.

revelação com MBTH, e o derivado acetilado (por anidrido acético/piridina) apresentou um R_f maior que a patulina.

O teste de confirmação sugerido pela AOAC (1990), que consiste apenas no desenvolvimento da placa de sílica em diferentes solventes, foi também realizado, demonstrando o mesmo comportamento para a patulina da amostra e para o padrão.

Os espectros de absorvância obtidos no início, máximo e fim do pico cromatográfico pelo detector por arranjo de diodos (FIGURA 24), demonstraram a pureza do pico de patulina.

4.2.2- Incidência em Sucos e Frutas

Foram analisadas 65 amostras de sucos de frutas, a saber: maçã (20), uva (17), abacaxi (10), goiaba (6), manga (6), mamão (3) e banana (3). Foram analisadas também 24 amostras de frutas, sendo 15 amostras de maçã, 6 de mamão e 3 de manga (Tabela 18). Foram escolhidas frutas que, a exemplo da maçã, apresentam manchas pretas quando estragadas.

Do total de 95 amostras avaliadas, somente uma de suco de maçã estava contaminada com 17 ug/L. Este teor está abaixo do limite proposto para patulina, que é de 50 ug/ L para sucos de frutas na Áustria, Bélgica, França, Suíça e Suécia e de 20 ug/ L para alimentos infantis na Tchecoslováquia (EGMOND, 1989).

TABELA 18- Incidência de patulina em sucos e frutas.

Produto	No. de amostras analisadas	No. de marcas	No. de amostras positivas (Teor)
suco de maçã	20	4	1 (17ug/L)
suco de uva	17	4	0
suco de abacaxi	10	3	0
suco de goiaba	6	2	0
suco de manga	6	2	0
suco de banana	3	1	0
suco de mamão	3	1	0
maçã	15	-	0
mamão	6	-	0
manga	3	-	0
Total	89		1

As análises foram feitas em duplicatas

MACHINSKY & MIDIO (1992) analisaram 22 amostras de suco de maçã brasileiras e encontraram duas contaminadas com patulina em níveis de 8 e 10 ug/ L.

Como teste adicional da confiabilidade do método, foram analisadas seis amostras de maçãs deterioradas tendo sido obtidos teores de patulina que variaram entre 150 a 340 ug/ kg (TABELA 19).

Os resultados sugerem que somente maçãs de boa qualidade estão sendo usadas na fabricação de suco de maçã e que a contaminação por patulina não parece ser problemática nas frutas e sucos de frutas da região de Campinas. Pelas razões citadas para AFM₁, no entanto, o levantamento deve ser continuado por alguns anos.

4.3- ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO

4.3.1- Estabelecimento do Método

O método de URANO *et alii* (1992a) para determinação de ácido ciclopiazônico foi testado em amostras de amendoim e milho artificialmente contaminadas tendo se mostrado suficientemente eficiente de forma a ser escolhido para estudar a incidência desta toxina em amendoim e milho. O limite de detecção conseguido foi de 50 ug/kg.

TABELA 19- Teores de patulina em maçã estragada.

Amostra	Teor de patulina (ug/ kg)
1	198
2	150
3	221
4	267
5	236
6	250
média	220

As análises foram realizadas em duplicata

Os espectros de absorvância obtidos pelo detector por arranjo de diodos no início, máximo e fim do pico cromatográfico demonstraram a pureza do pico e a identidade do ácido ciclopiazônico (FIGURA 26). A confirmação foi também realizada por co-cromatografia em camada delgada de sílica gel , utilizando-se vários sistemas de solventes e reação com p-dimetilaminobenzaldeído.

Foram obtidos valores de recuperação acima de 85% (Tabela 20), da mesma ordem de grandeza dos citados na literatura (LANSDEN & DAVIDSON, 1983; LANSDEN, 1984, 1986; URANO *et alii*, 1992b). Na FIGURA 27 estão mostrados os cromatogramas característicos de padrão de ácido ciclopiazônico e de ácido ciclopiazônico de uma amostra de amendoim contaminado e, na FIGURA 28, os cromatogramas de uma amostra de milho artificialmente contaminado com a toxina e de uma amostra de milho não contaminado.

Foi feita a tentativa de se injetar amostra não submetida à etapa de limpeza em coluna cromatográfica porem os cromatogramas obtidos apresentaram vários picos que não permitiram uma boa separação do ácido ciclopiazônico tanto na amostra de amendoim como na de milho (FIGURA 29).

4.3.2- Incidência em amendoim e milho

Foram analisadas 12 amostras de amendoim cru, 16 de produtos de amendoim (8 amostras de amendoim torrado salgado e 8 de paçoca), 9 de milho de pipoca, 8 de farinha de milho e 8 de

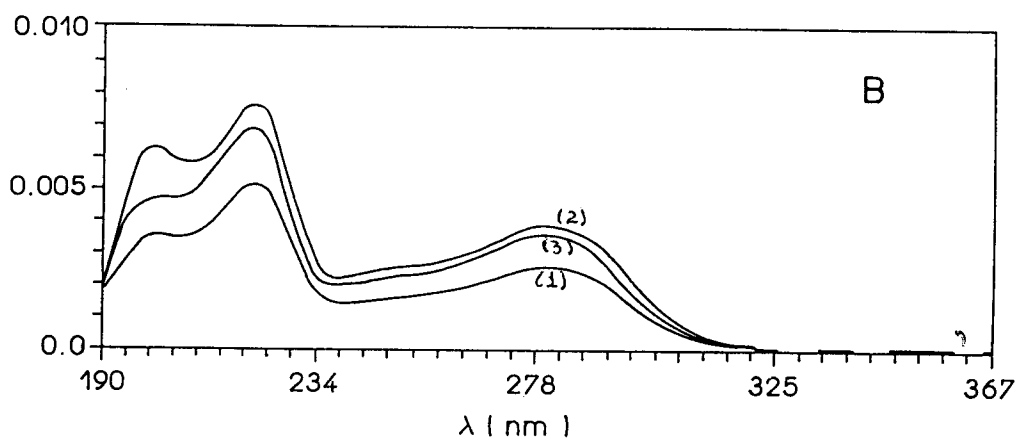
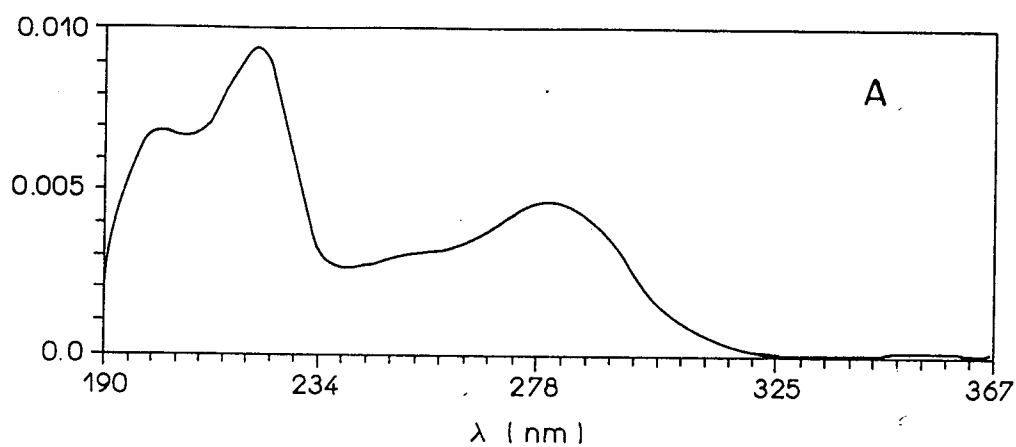


FIGURA 26- Confirmação e teste de pureza - espectros de absorvancia característicos de padrão de ácido ciclopiazônico (A) e de uma amostra de amendoim contaminado (B) obtidos pelo detector de arranjo de diodos, para o último no início (2), máximo (2) e fim do pico (3).

TABELA 20- Recuperação do ácido ciclopiazônico adicionado ao amendoim pelo método de URANO et alii (1992).

Quantidade adicionada (ug/kg)	Recuperação(%)	
	Média ^a	Desvio padrão
100	85,8	8,3
150	88,3	7,9
200	89,5	6,9

^a os valores são médias de 3 repetições em duplicatas para cada nível.

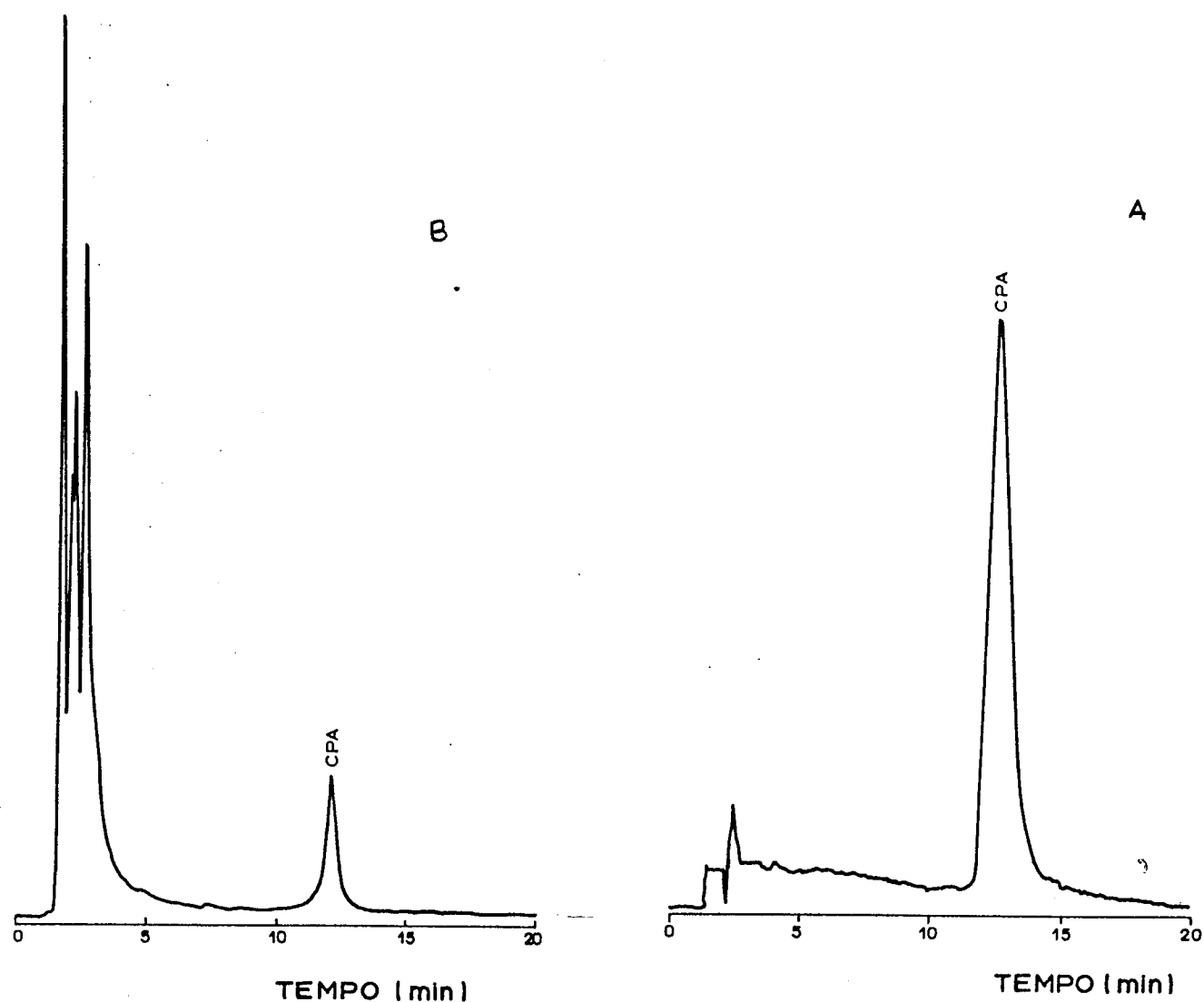


FIGURA 27- Cromatogramas característicos de padrão de ácido ciclopiazônico (A) e de uma amostra de amendoim contaminado (B). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 μ m (150X4,6 mm); fase móvel gradiente linear de 0-4 mM de sulfato de zinco em metanol 85%; vazão de 1,5 mL/min; detector por arranjo de diodos a 282 nm.

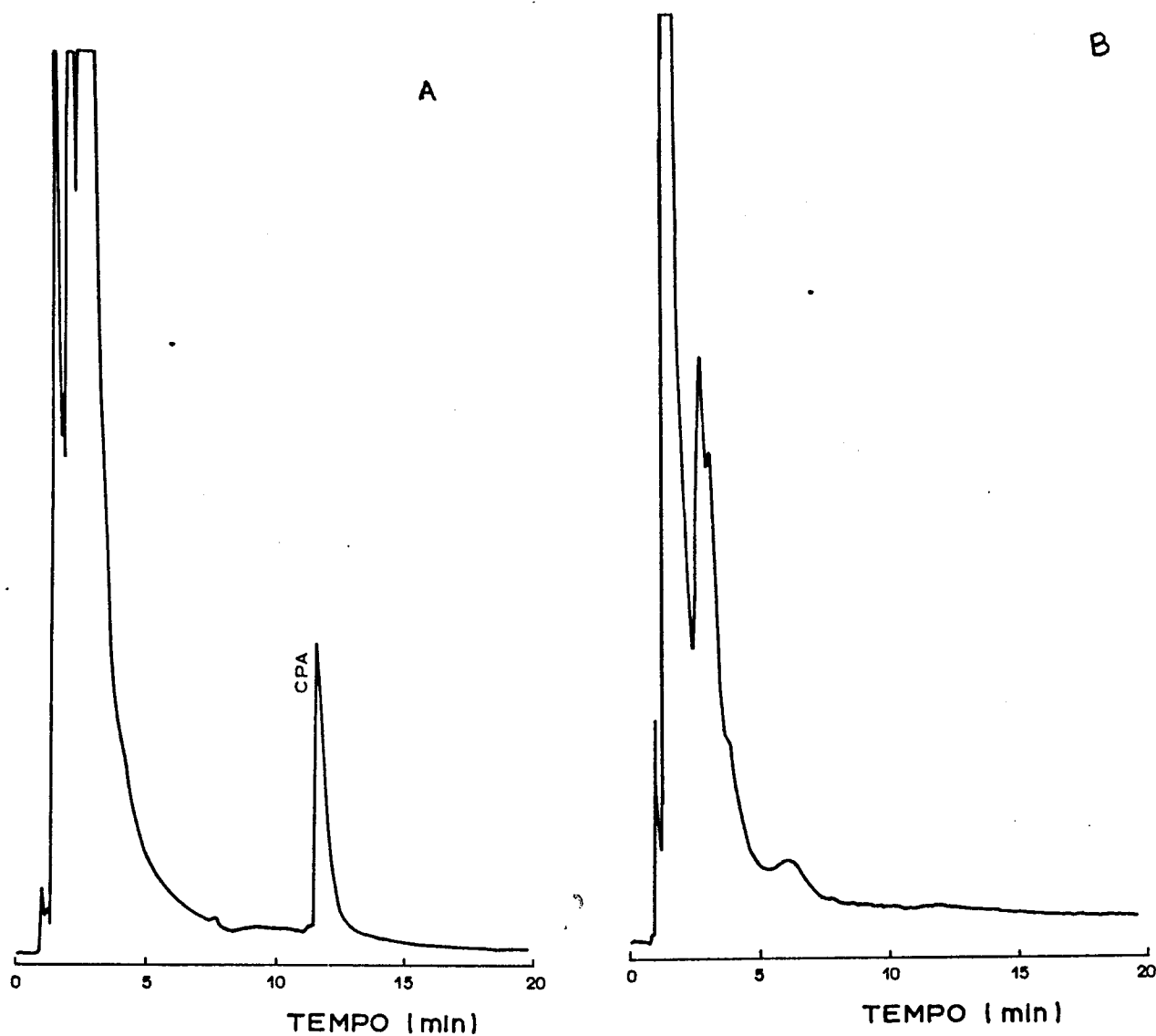


FIGURA 28- Cromatogramas característicos de uma amostra de milho artificialmente contaminado com ácido ciclopiazônico (A) e de uma amostra de milho não contaminado (B). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 μ m (155X4,6 mm); fase móvel gradiente linear de 0-4 mM de sulfato de zinco em metanol 85%; fluxo de 1,5 mL/min; detector por arranjo de diodos a 282 nm.

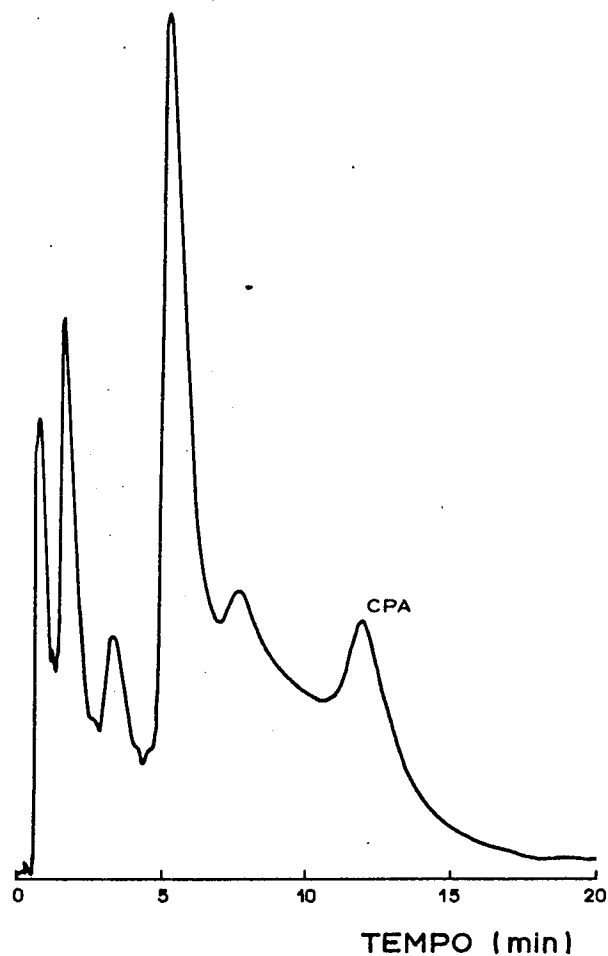


FIGURA 29- Cromatograma obtido de uma amostra de amendoim contaminado com ácido ciclopiazônico obtido pelo método de URANO et alii sem a etapa de limpeza. Condições cromatográficas: coluna Spherisorb ODS-1, 5 μ m (150X4,6 mm); fase móvel gradiente linear 0-4mM de sulfato de zinco em metanol 85%; fluxo de 1,5 mL/min; detector de arranjo de diodos a 282 nm.

fubá, quanto à presença de ácido ciclopiazônico (TABELA 21). De um total de 28 amostras de amendoim, o ácido ciclopiazônico foi detectado em quatro amostras de amendoim cru com níveis entre 150 a 369 ug/ kg (TABELA 22). As aflatoxinas por sua vez, foram encontradas em 11 amostras de amendoim com níveis entre 8 e 320 ug/ kg, sendo que sete superaram o limite de 30 ug/kg de AFB₁ + AFG₁, estabelacido pela Legislação Brasileira.

Tanto o ácido ciclopiazônico como as aflatoxinas B e G não foram encontradas em amostras de milho e seus produtos.

O número de amostras analisadas ainda é pequeno para se ter uma idéia confiável da co-ocorrência de ácido ciclopiazônico e aflatoxinas em amendoim e milho. A alta incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados em Campinas já foi demonstrado anteriormente (SCUSSEL & RODRIGUEZ-AMAYA, 1985 ; SYLOS & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989), bem como a sua baixa incidência em milho (SCUSSEL & RODRIGUEZ-AMAYA, 1986 ; SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Chama atenção, no entanto, o fato da taxa de contaminação de ácido ciclopiazônico, observada no presente trabalho ser bem menor que a constatada no exterior (GALLAGHER *et alii*, 1978; WIDIASTUTI *et alii*, 1988; URANO *et alii*, 1992b).

TABELA 21- Incidência de ácido ciclopiazônico e aflatoxinas em produtos de amendoim e de milho^a.

Produto	No. de amostras analisadas	No. de amostras positivas	
		ácido ciclopiazônico	Aflatoxinas
amendoim cru	12	4	5
amendoim torrado	8	0	3
paçoca	8	0	3
milho de pipoca	9	0	0
farinha de milho	8	0	0
fubá	8	0	0
Total	53	4	11

^a análises feitas em duplicata

TABELA 22- Incidência de ácido ciclopiazônico e aflatoxinas nas amostras positivas.

Produto	Concentração (ug/ kg) ^a				
	ácido ciclopiazônico	aflatoxinas			
		B1	B2	G1	G2
Amendoim cru					
1	150	ND	ND	ND	ND
2	ND	8	ND	ND	ND
3	245	30	ND	ND	ND
4	ND	32	13	ND	ND
5	369	40	8	50	ND
6	316	55	16	24	22
Amendoim torrado					
1	ND	15	ND	ND	ND
2	ND	25	10	ND	ND
3	ND	31	7	12	ND
Paçoca					
1	ND	35	ND	ND	ND
2	ND	55	26	38	21
3	ND	118	70	72	60

ND não detectado

^a análise feita em duplicata

5- CONCLUSÕES

a) Nenhum dos sais de metais pesados testados no presente trabalho (acetato de chumbo, acetato de zinco, sulfato de cobre, sulfato de amônia, sulfato de zinco e carbonato de cobre) provou ser eficiente na remoção de interferentes para a determinação de aflatoxina M_1 em leite e derivados.

b) O uso de coluna cromatográfica mostrou-se necessário na remoção dos interferentes na quantificação de aflatoxina M_1 em amostras de leite e derivados, sendo a sílica e sílica- C_{18} os adsorventes mais adequados. A coluna de celulose revelou-se a menos eficiente.

c) O método da AOAC para determinação de aflatoxina M_1 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector por fluorescência e derivados com ácido trifluoroacético apresentou sensibilidade e especificidade muito maiores que o método por cromatografia em camada delgada com quantificação por comparação visual.

d) A contaminação de leite e derivados comercializados na cidade de Campinas por aflatoxina M_1 é atualmente baixa, não constituindo problema de saúde pública.

e) O método de MOLLER & JOSEFSSON para determinação de patulina, apesar de ter sido introduzido originalmente para triagem, demonstrou-se adequado do ponto de vista quantitativo, superando os métodos da AOAC e de SIRIWARDANA & LAFONT, mesmo com quantificação por CLAE.

f) A contaminação por patulina em frutas (maçã, mamão e manga) e sucos de frutas (maçã, uva, abacaxi, manga, goiaba, banana e mamão) comercializados na cidade de Campinas não parece ser problemática. A matéria-prima utilizada para a fabricação de sucos demonstra ser de boa qualidade.

g) O ácido ciclopiazônico não parece ser um contaminante natural do milho e seus derivados comercializados em Campinas.

h) A contaminação por ácido ciclopiazônico juntamente com aflatoxinas B e G pode ser um problema no amendoim e seus derivados comercializados em Campinas.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLCROFT, R. & CARNAGHAN, R. B. A. Groundnut toxicity: An examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. *Vet. Rec.* **75**(2): 259-263, 1963.
- ALTMAYER, B.; EICHBORN, K.W. & PLAPP, R. Analysis of patulin in grape juices and wine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **175**(2): 172-174, 1982.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. The Reference. **17**(9): 10, 1993.
- BARNES, J.M. Aflatoxin as a health hazard. *J. Appl. Bacteriol.* **32**: 285-298, 1970.
- BIJL, J. P.; PETEGHEM, C. H. van & DEKEYSER, D. A. Fluorimetric determination of aflatoxin M₁ in cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**(3): 472-745, 1987.
- BLANC, M. M. & KARLESKIND, A. Données sur la contamination par l'aflatoxine M₁ du lait et des produits laitiers en France. *Le Lait* **61**(5): 481-493, 1981.

BLANCO, J. L.; DOMINGUEZ, L.; GOMES-LUCIA, E.; GARAYZABAL, J. F. F.; GOYACHE, J. & SUAREZ, G. Behavior of aflatoxin during the manufacture, ripening and storage of Manchego-type cheese. *J. Food Sci.* **53**(5): 1373-1376, 1988a.

BLANCO, J. L.; DOMINGUEZ, L.; GOMEZ-LUCIA, E.; GARAYZABAL, J. F. F., GARCIA, J. A. & SUAREZ, G. Presence of aflatoxin M₁ in commercial ultra-high-temperature-treated milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(6): 1622-1623, 1988b.

BOCCIA, A.; MICCO, C.; MIRAGLIA, M. & SCIOLI, M. A study on milk contamination by aflatoxin M₁ in a restricted area in Central Italy. 6th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, resumo, 69, 1985. Citado em PIVA, G.; PIETRI, A.; GALAZZI, L. & CURTO, O. Aflatoxin M₁ occurrence in dairy products marketed in Italy. *Food Additives Contaminants* **5**(2): 133-139, 1987.

BOHUON, G. & DRULLEAU, J.F. La patuline dans les concentrés de jus de pomme. *Ann. Fals. Exp. Chem.* **73**(2): 153-156, 1980.

BOURDIOL, D.; ESCOULA, L. & SALVAYRE, R. Effect of patulin on microbicidal activity of mouse peritoneal macrophages. *Food Chem. Toxic.* **28**(1): 29-33, 1990.

- BRACKETT, R. E. & MARTH, E. H. Patulin in apple juice from roadside stands in Wisconsin. *J. Food Prot.* **42**(11): 862-863, 1979.
- BRIAN, P.W.; ELSON, G.W. & LOWE, D. Production of patulin in apple fruits by *Penicillium expansum*. *Nature* **178**: 263-264, 1956.
- BUCHANAN, J. R.; SOMMER, N. F.; FORTLAGE, R. J.; MAXIE, E. C. & HSIEH, D. P. H. Patulin from *Penicillium expansum* in stone fruits and pears. *J. Amer. Soc. Hort.* **99**(2): 262-265, 1974.
- BULLERMAN, L. B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J. Food Protec.* **42**(1): 65-86, 1979.
- BULLERMAN, L. B. Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin production. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* **18**(3): 197-200, 1985.
- BURDA, K. Incidence of patulin in apple, pear, and mixed fruit products marketed in new South Wales. *J. Food Prot.* **55**(10): 796-798, 1992.

BURDASPAL, P.A. & PINILLA, I. Estudio de la contaminacion natural por micotoxinas en manzanas y otros productos. Aplicacion de un nuevo metodo de multideteccion. *Alimentaria* 107(1): 35-37, 1979.

BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. & PINILLA, I. Incidencia de la contaminacion por aflatoxina M₁ en leche. Rev. *Agroquim. Tecnol. Aliment.* 23(2): 287-290, 1983.

BURROUGHS, L. F. Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60(1): 100-103, 1977.

CARISANO, A. & DELLA TORRE, G. Sensivite reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in dry milk. *J. Chromatogr.* 355(1): 340-344, 1986.

CHANBON, P. ; DANO, S. D. ; CHAMBON, R. & GEAHCHAN, A. Rapid determination of aflatoxin M₁ milk and dairy products by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 259(2): 372-374, 1983.

CHANG, H. L. & DeVRIES, J. W. Rapid pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk and nonfat dry milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66(4): 913-917, 1983.

CHANG-YEN, I. & BIDASEE, K. Improved spectrophotometric determination of cyclopiazonic acid in poultry feed and corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73**(2): 257-259, 1990.

CHAYTOR, J. P. & SAXBY, M. J. Determination of patulin and penicillic acid in unroasted cocoa beans. *J. Chromatography* **214**(1): 135-139, 1981.

CIEGLER, A. ; BECKWITH, A. C. & JACKSON, L. K. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**(5): 664-667, 1976.

COLE, R.J. Etiology of Turkey "X" disease in retrospect: A case for the involvement of cyclopiazonic acid. *Mycotoxin Res.* **2**(1): 3-7, 1986.

CULLEN, J. M.; WILSON, M.; HAGLER Jr, W. M.; ORT, J. F. & COLE, R. J. Histologic lesions in broiler chicks given cyclopiazonic acid orally. *Am. J. Vet. Res.* **49**(5): 728-731, 1988.

DELLA ROSA, H. V. & MORAES, E. C. F. Determinação de resíduos de aflatoxina M₁ em leite, por fluordensitometria. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo.* **17**(2): 270-284, 1981.

- DAMOGLOU, A. P.; CAMPBELL, D. S. & BUTTON, J. E. Some factors governing the production of patulin in apples. *Food Microbiol.* **2**(1): 3-10, 1985.
- DOMINGUEZ, L.; BLANCO, J. L.; GOMEZ-LUCIA, E.; RODRIGUEZ, E. F. & SUAREZ, G. Determination of aflatoxin M₁ in milk and milk products contaminated at low levels. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**(3): 470-472, 1987.
- DORNER, J. W. Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus tamarii* kita. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(6): 1435-1437, 1983.
- DORNER, J. W.; COLE, R. J.; LOMAX, L. G.; GASSER, H. S.; DIENER, U. L. Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effects on broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(3): 698-703, 1983.
- DORNER, J. W.; COLE, R. J. & DIENER, U. L. The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxin and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia* **87**(1): 13-15, 1984.
- DUTTON, M.F. & WESTLAKE, K. Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**(5): 839-843, 1985.

- EGMOND, H. P. van; PAULSCH, W. E. & SCHULLER, P. L. Confirmatory test for aflatoxin M₁ on a thin layer plate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **61**(4): 809-812, 1978.
- EGMOND, H.P. van & STUBBLEFIELD, R.D. Improved method for confirmation of the identity of aflatoxin B₁ and M₁ dairy products and animal tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64**(1): 152-155, 1981.
- EGMOND, H.P. van & PAULSCH, W.E. Micotoxins in milk and milk products. *Neth. Milk Dairy J.* **40**: 175-188, 1986.
- EGMOND, H. P. van; LEUSSINK, A. B. & PAULSCH, W. E. The determination of aflatoxin M₁ in milk powder. *Bull. Int. Dairy Fed.* **207**: 150-197, 1986.
- EGMOND, H. P. van. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food Additives Contaminants* **6** (2): 139-188, 1989.
- ENGEL, G. & TEUBER, M. Patulin and other small lactones. In Betina, V : *Mycotoxins - Production, Isolation, Separation and Purification*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V, 1984. cap. 13, 291-314.

FERGUNSON-FOOS, J. & WARREN, J. D. Improved cleanup for liquid chromatographic analysis and fluorescence detection of aflatoxin M₁ and M₂ in fluid milk products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **67**(6): 1111-1114, 1984.

FINOLI, C.; VECCHIO, A.; BELLAVITA, M. & CERUTTI, G. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Il latte* **8**(9): 611-625, 1983.

FORBITO P. R. & BABSKY, N. E. Rapid liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**(5): 950-951, 1985.

FRIESEN, M.D. & GARREN, L. International mycotoxin check sample program: Part II. Report on laboratory performance for determination of aflatoxin M₁ in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **65**(4): 864-868, 1982.

FRITZ, W.; BUTHIG, Cl. & ENGST, R. On the determination and the hygienic-toxicologic significance of patulin in fruits and fruit products. *Nahrung* **23**(2): 159-167, 1979.

FROBISH, R.A.; BRADLEY, B.D.; WAGNER, D.D.; LONG-BRADLEY, P.E. & HAIRSTON, H. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J. Food Prot.* **49**(10): 781-785, 1986.

- FUJIMOTO, Y.; SUZUKI, T. & HOSHINO, Y. Determination of penicillic acid and patulin by gas-liquid chromatography with an electron-capture detector. *J. Chromatography* **105**(1): 99-106, 1975.
- FUKAYAMA, M.; WINTERLIN, W. & HSIEH, D. P. H. Rapid method for analysis of aflatoxin M₁ in dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**(4): 927-930, 1980.
- GALLAGHER, R. T.; RICHARD, J. L.; STAHR, H. M. & COLE, R. J. Cyclopiazonic acid production by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia* **66**(1/2): 31-36, 1978.
- GAZA, H. C.; SWANSON, B. G. & BRANEN, A. L. Toxicological study of patulin in monkeys. *J. Food Sci.* **42**(5): 1229-1231, 1977.
- GAUCH, R.; LEUENBERGER, U. & BAUMGARTNER, E. Rapid and simple determination of aflatoxin M₁ in 10¹² range. *J. Chromatogr.* **178**(2): 543-549, 1979.
- GILBERT, J.; SHEPHERD, M. J.; WALLWORK, M. A. & KNOWLES, M. E. A survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in UK-produced milk for the period 1981-1983. *Food Additives Contaminants* **1**(1): 23-28, 1984.

GORST-ALLMAN, C. P. & STEYN, P. S. Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins. *J. Chromatogr.* **175**: 325-331, 1979.

GOTO, T.; SHINSHI, E.; TANAKA, K. & MANABE, M. Analysis of cyclopiazonic acid by normal phase high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* **51**(9): 2582-2583, 1987.

HARWING, J.; CHEN, Y. K.; KENNEDY, B. P. C. & SCOTT, P. M. Occurrence of patulin and producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada. *Canadian Inst. Food Sci. Tech. J.* **6**(1): 22-25, 1973a.

HARWIG, J.; SCOTT, P. M.; KENNEDY, B. P. C. Disappearance of patulin from apple juice fermented by *Saccharomyces* spp. *J. Inst. Can. Technol. Aliment.* **6**(1): 45-46, 1973b.

HOLZAPFEL, C.W. The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* westling. *Tetrahedron* **24**(11): 2101-2119, 1968.

HUNT, D. C.; BOURDON, A. T. & CROSBY, N. T. Use of high performance liquid chromatography for the identification and estimation of zearalenone, patulin and penicillic acid in food. *J. Sci. Food Agric.* **29**(2): 239-244, 1978.

HURST, W. J., SNYDER, K. P. & MARTIN Jr., R. A. High-performance liquid chromatographic determination of the mycotoxins patulin, penicillic acid, zearalenone and sterigmatocystin in artificially contaminated cocoa beans. *J. Chromatogr.* **392**(1): 391-396, 1987.

JASKIEWICZ, K.; CLOSE, P. M.; THIEL, P. G. & COLE, R. J. Preliminary studies on toxic effects of cyclopiazonic acid alone and in combination with aflatoxin B₁ in non-human primates. *Toxicology* **52**(3): 297-307, 1988.

JOSEFSSON, E. & ANDERSSON, A. Analysis of patulin in apple beverages sold in Sweden. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* **54**: 261-267, 1977.

KIERMEIER, F. Aflatoxin residues in fluid milk. *Pure Appl. Chem.* **35**: 271-273, 1973.

KUBACKI, S. J. & GOSZCZ, H. A collaborative study of HPLC methods for the determination of patulin in apple juice. *Pure Appl. Chem.* **60**(6): 871-876, 1988.

LANSDEN, J. A. & DAVIDSON, J. I. Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(3): 766-769, 1983.

LANSDEN, J. A. Liquid chromatographic analysis system for cyclopiazonic acid in peanuts. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **67**(4): 728-731, 1984.

LANSDEN, J. A. Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **69**(6): 964-966, 1986.

LeBARS, J. Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**(6): 1052-1055, 1979.

LINDROTH, S.L. & NISKANEN, A. Comparison of potencial patulin hazard in home-made and commercial apple products. *J. Food Sci.* **43**(3): 446-448, 1978.

LOVETT, J. & PEELER, J. T. Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution. *J. Food Sci.* **38**(4): 1094-1096, 1973.

- MACHINSKY, M. & MIDIO, A. F. Determinação de patulina em suco de maçã. /Resumos, VII Encontro Nacional de Micotoxinas, São Paulo, maio 1992.
- MAFFEO, G. & LAERI, L. Osservazioni sulla presenza di aflatossina M₁ nel latte del comprensorio milanese. *Il Latte* 6 : 601-603, 1981.
- MARSI, M.S.; GARCIA, V.C. & PAGE, J.R. Aflatoxin M content of milk from cows fed known amounts of aflatoxin. *Vet. Rec.* 84: 146-147, 1969.
- McKINNEY, J. D.; CAVANAGH, G. C.; BELL, J. T. HOVERSLAND, A. S.; NELSON, D. M.; PEARSON, J. & SELKIRK, R. J. Effects of ammoniation on aflatoxins in rations fed lactating cows. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 50(3): 79-84, 1973.
- MEYER, R.A. On the determination of patulin in foods - Proposition of a standard method. *Nahrung* 26(4): 337-342, 1982.
- MOLLER, T. E. & JOSEFSSON, E. Rapid high pressure liquid chromatography of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63(5): 1055-1056, 1980.

- MOLLER, T.E. Patulin in apple and pear products. Var Foda 38(7): 404-406, 1986. Em Food Science Technology Abstract 19(7), J42, 1987.
- MORTIMER, D. N.; PARKER, I.; SHEPHERD, M. J. & GILBERT, J. A limited survey of retail apple and grape juices for the mycotoxin patulin. *Food Additives Contaminants* 2(1): 165-170, 1987.
- MORRISSEY, R. E.; NORRED, W. P.; COLE, R. J. & DORNER, J. Toxicity of the mycotoxin, cyclopiazonic acid, to Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77: 94-107, 1985.
- MORRISSEY, R. E.; NORRED, W. P.; HINTON, D. M.; COLE, R. J. & DORNER, J. W. Combined effects of the mycotoxins aflatoxin B₁ and cyclopiazonic acid on Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxic.* 25(11): 837-842, 1987.
- NABNEY, J. & BURBAGE, M.B. Metabolism of aflatoxin in the lactating ewe. *Food Cosmet. Toxicol.* 5: 11-17, 1967.
- NISHIE, K.; COLE, R.J. & DORNER, J.W. Toxicity and neuro pharmacology of cyclopiazonic acid. *Food Chem. Toxic.* 23(9): 831-839, 1985.

- NORRED, W. P.; MORRISSEY, R. E.; RILEY, R. T.; COLE, R. J. & DORNER, J.W. Distribution, excretion and skeletal muscle effects of the mycotoxin ^{14}C cyclopiazonic acid in rats. *Food Cosmet. Toxicol.* **23**(12): 1069-1076, 1985.
- NORRED, W. P.; COLE, R. J.; DORNER, J. W. e LANSDEN, J. A. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in poultry meat. *J.Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**(1): 121-123, 1987.
- NORRED, W. P.; PORTER, J. K.; DORNER, J. W. & COLE, R. J. Occurrence of the mycotoxin cyclopiazonic acid in meat after oral administration to chickens. *J. Agric. Food Chem.* **36**(1): 113-116, 1988.
- NORTHOLT, M. D.; EGMOND, H. P. van & PAULSCH, W. E. Patulin production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *J. Food Sci.* **41**(11): 885-890, 1978.

- NUEHRING, L. P.; ROWLAND, G. N.; HARRISON, L. R.; COLE, R. J. & DORNER, J. W. Cyclopiazonic acid mycotoxicosis in the dog. *Am. J. Vet. Res.* **46**(8): 1670-1676, 1985.
- OSSWALD, H.; FRANK, H.K.; KOMITOWSKI, D. & WINTER, H. Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-Dawley rats and swiss mice. *Food Cosmet. Toxicol.* **16**(2): 243-247, 1978.
- OUGH, C. S. & CORISON, C. A. Measurement of patulin in grapes and wines. *J. Food. Sci.* **45**(3): 476-478, 1980.
- PIER, A. C.; BELDEN, E. L.; ELLIS, J. A.; NELSON, E. W. & MAKI, L. R. Effects of cyclopiazonic acid and aflatoxin singly and in combination on selected clinical, pathological and immunological responses of guinea pigs. *Mycopathologia* **105**(2): 135-142, 1989.
- PIVA, G.; PIETRI, A.; GALAZZI, L. & CURTO, O. Aflatoxin M₁ occurrence in dairy products marketed in Italy. *Food Additives Contaminants* **5**(2): 133-139, 1987.
- POHLAND, A. E. & ALLEN, R. Stability studies with patulin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **53**(4): 688-691, 1970.

- POHLAND, A. E.; SANDERS, K. & THORPE, C. W. Determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **53**(4): 692-695, 1970.
- POLAN, C.E.; HAYES, J.R. & CAMPBELL, T.C. Consumption and fate of aflatoxin B₁ by lactating cows. *J. Agric. Food Chem.* **22**(3): 635-638, 1974.
- PRICE, R.L.; PAULSON, J.H.; LOUCH, O.G.; GINGG, C. & KURTZ, A.G. Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally contaminated whole cottonseed. *J. Food Prot.* **48**(1): 11-15, 1985.
- PRIETA, J. ; MORENO, M.A. ; BLANCO, J.L. ; SUAREZ, G. & DOMINGUEZ, L. Determination of patulin by diphasic dialysis extraction and thin-layer chromatography. *J. Food Prot.* **55**(12): 1001-1002, 1992.
- PURCHASE, I. F. H. Acute toxicity of aflatoxins M₁ and M₂ in one-day-old ducklings. *Food Cosmet. Toxicol.* **5**: 339-342, 1967.
- PURCHASE, I. F. H. The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **18**: 114-123, 1971.

PURCHASE, I. F. H.; STEYN, M.; RINSMA, R. & TUSTIN, R. C.
Reduction of the aflatoxin M content of milk by processing.
Food Cosmet. Toxicol. **10**: 383-387, 1972.

RALLS, J. W. & LANG, R. M. Examination of cider vinegar for
patulin using mass spectrometry. *J. Food Sci.* **42**(4): 1117-
1119, 1977.

RAO, B. L. e HUSAIN, A. Presence of cyclopiazonic acid in
kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing "kodua
poisoning" in man and its production by associated fungi.
Mycopathologia **89**: 177-180, 1985.

RATHINAVELU, A. & SHANMUGASUNDARAM, E. R. B. Simple
colorimetric estimation of cyclopiazonic acid in contaminated
food and feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **67**(1): 38-40, 1984.

REDDY, C. S.; CHAN, P. K. & HAYES, A. W. Teratogenic and
dominant lethal studies of patulin in mice. *Toxicology*
11(3): 219-223, 1978.

REISS, J. N-methylbenzothiazolone-(2)-hydrazone (Besthons
hydrazone) as a sensitive spray reagent for patulin. *J.*
Chromatography **86**(1): 190-191, 1973.

- REISS, J. Mycotoxin poisoning of *Allium cepa* root tips II. Reduction of mitotic index and formation of chromosomal aberrations and cytological abnormalities by patulin, rubratoxin B and diacetoxyscirpenol. *Cytologia* **40**(4): 703-708, 1975.
- RIBBERZANI, A.; CASTELLI, S.; DELVO, A. & PEDRETTI, C. Aflatossina M₁ in alcuni alimenti a base di latte. *Industrie Alimentari* **22**: 342-346, 1983.
- RICE, S. L. Patulin production by *Byssosclamyces* spp. in canned grape juice. *J. Food Sci.* **45**(3): 485-458, 1980.
- RICHARD, J. L.; PEDEN, W. M.; FICHTNER, R. E. & COLE, R. J. Effect of cyclopiazonic acid on delayed hypersensitivity to *Mycobacterium tuberculosis*, complement activity, serum enzymes, and bilirubin guinea pigs. *Mycopathologia* **96**(1): 73-77, 1986.
- ROMER, T.R. Screening method for the determination of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **58**(3): 500-506, 1975.

ROSEN, J. D. & PARELES, S. R. Quantitative analysis of patulin in apple juice. *J. Agric. Food Chem.* **22**(6): 1024-1026, 1974.

SABINO, M.; PURCHIO, A. & ZORZETTO, M. A. Variation in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. *Food Additives Contaminants* **6** (3): 321-326, 1989.

SCHULLER, P. L.; VERHULSDONK, C. A. H. & PAULSCH, W. E. Analysis of aflatoxin M₁ in liquid and powdered milk. *Pure Appl. Chem.* **35**: 291- 296, 1973.

SCOTT, P. M. & SOMERS, E. Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. *J. Agric. Food Chem.* **16**(3): 483-485, 1968.

SCOTT, P. M.; MILES, W. F.; TOFT, P. & DUBÉ, J. G. Occurrence of patulin in apple juice. *J. Agric. Food Chem.* **20**(2): 450-451, 1972.

SCOTT, P. M. & KENNEDY, B. P. C. Improved method for the thin layer chromatographic determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **56**(4): 813-816, 1973.

SCOTT, P. M. Collaborative study of a chromatographic method for determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **57**(3): 621-625, 1974.

SCOTT, P. M. Methods of determination of aflatoxin M₁ in milk and milk products - a review of performance characteristics. *Food Additives Contaminants* **6**(3): 283-305, 1989.

6

SCOTT, P. M. Natural Poisons. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Arlington, Virginia, A.O.A.C., 1990. v.2, cap.49, p.1184-1213.

SCUSSEL, V.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980-1982. *BOL. SBCTA* **19**(2): 109- 119, 1985.

SCUSSEL, V.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & SILVA, W.J. Incidência de aflatoxinas em milho (*Zea mays L.*) e em seus produtos derivados, comercializados na região de Campinas, São paulo, Brasil. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **6**(1): 75-85, 1986.

SERRALHEIRO, M. L. & QUINTA, M. L. Rapid thin layer chromatographic determination of aflatoxin M₁ in powdered milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**(5): 952-954, 1985.

SERRALHEIRO, M. L. & QUINTA, M. L. Thin layer chromatographic confirmation of aflatoxin M₁ extracted from milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **69**(5): 886-888, 1986.

SHEPHERD, M. J.; HOLMES, S. & GILBERT, J. Comparison and critical evaluation of six published extraction and clean-up procedures for aflatoxin M₁ in liquid milk. *J. Chromatogr.* **354**: 305-315, 1986.

SINNHUBER, R. O.; LEE, D. J.; WALES, J. H.; LANDERS, M. K. & KEYL, A. C. Aflatoxin M₁, a potent liver carcinogen for rainbow trout. *Fed. Proc.* **29**: 568 (Abstr. 1800), 1970.

SIRIWARDANA, M. G. & LAFONT, P. Determination of mycophenolic acid, penicillic acid, patulin, sterigmatocystin, and aflatoxins in cheese. *J. Dairy Sci.* **62**: 1145-1148, 1979a.

SIRIWARDANA, M. G. & LAFONT, P. Méthode densitométrique de dosage de la patuline dans les jus de fruits. *J. Chromatography* **173**: 425-428, 1979b.

SMITH, E. E.; KUBENA, L. F.; BRAITHWAITE, C. E.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D. & REINE, A. H. Toxicological evaluation of aflatoxin and cyplopiazonic acid in broiler chickens. *Poultry Sci.* **71**(8) 1136-1144, 1992.

- SOARES, L.M.V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using a multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**(1): 22-26, 1989.
- SOMMER, N. F.; BUCHANAN, J. R. & FORTLAGE, R. J. Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Appl. Microbiol.* **28**(4): 589-593, 1974.
- SORENSEN, W. G.; TUCKER, J. D. & SIMPSON, J. P. Mutagenicity of the tetramic mycotoxin cyclopiazonic acid. *Appl. Environm. Microbiol.* **47**(6): 1355-1357, 1984.
- SPEIJERS, G. J. A.; FRANKEN, M. A. M. & LEEUWEN, F. X. R. Subacute toxicity study of patulin in the rat: Effects on the kidney and the gastro-intestinal tract. *Food Chem. Toxic.* **26**(1): 23-30, 1988.
- STACK, M. E.; POHLAND, A. E.; DANTZMAN, J. G. & NESHEIM, S. Derivative method for chemical confirmation of identity of aflatoxin M₁. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **55**(2): 343-344, 1972.

STINSON, E. E.; OSMAN, S. F.; HUHTANEN, C. N. & BILLS, D. D. Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**(4): 620-622, 1978.

STINSON, E. E.; OSMAN, S. F. & BILLS, D. D. Water-soluble products from patulin during alcoholic fermentation of apple juice. *J. Food Sci.* **44**(3): 788-789, 796, 1979.

STOLOFF, L.; TRUCKNESS, M.; HARDIN, N.; FRANCIS, O. J.; HAYES, J. R.; POLAN, C. E. & CAMPBELL, T. C. Stability of aflatoxin M₁ in milk. *J. Dairy Sci.* **58**: 1789-1793, 1975.

STOLOFF, L. Aflatoxin M in perspective. *J. Food. Protec.* **43**(3): 226-230, 1980.

STOTT, W. T. & BULLERMAN, L. B. Patulin: a mycotoxin of potential concern in foods. *J. Milk Food Technol.* **38**(11): 695-697, 1975a.

STOTT, W. T. & BULLERMAN, L. B. Microbiological assay of patulin, using *Bacillus megaterium*. patulin, using *Chem.* **58**(3): 497-499, 1975b.

STRAY, H. High pressure liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **61**(6): 1359-1362, 1978.

STUBBLEFIELD, R. D. & SHANNON, G. M. Aflatoxin M₁ : Analysis in dairy products and distribution in dairy foods made from artificially contaminated milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **57**(4): 847-851, 1974a.

STUBBLEFIELD, R.D. & SHANNON, G.M. Collaborative study of methods for the determination and chemical confirmation of aflatoxin M₁ in dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **57**(4): 852-857, 1974b.

STUBBLEFIELD, R. D. . The rapid determination of aflatoxin M₁ in dairy products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **56**(9): 800-802, 1979.

STUBBLEFIELD, R. D.; EGMOND, H. P. van; PAULSCH, W. E. & SCHULLER, P. L. Determination and confirmation of identity of aflatoxin M₁ in dairy products: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**(4):907- 921, 1980.

STUBBLEFIELD, R. D. Optimum conditions for formation of aflatoxin M₁ - trifluoroacetic acid derivative. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**(6): 1047-1049, 1987.

- SUBRAMANIAN, T. Colorimetric determination of patulin produced by *penicillium patulum*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **65**(1): 5-7, 1982.
- SYLOS, C.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Inexpensive rapid screening method for aflatoxins in peanuts and peanut products. *J. Sci. Food Agric.* **49**(1): 167-172, 1989.
- TAKEDA, N. Determination of aflatoxin M₁ in milk by reversed-phase-high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **288**:484-488, 1984.
- TANIWAKI, M. H., BLEINROTH, E. W. & MARTIN, Z. J. Bolores produtores de patulina em maçã e suco industrisalizado. *Colet. ITAL* **19**(1): 42-49, 1989.
- TRUCKSESS, M. W.; MISLIVEC, P. B.; YOUNG, K.; BRUCE, V. R. e PAGE, S. W. Ciclopiazonic acid production by cultures of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from dried beans, corn meal, macaroni and pecans. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**(1): 123-126, 1987.
- TUINSTRA, L. G. M. & BRONGSEEST, J. M. Determination of aflatoxin M₁ in milk at the parts per trillion level. *J. Chromatogr.* **111**: 448-451, 1975.

- URANO, T.; TRUCKSESS, M. W.; MATUSK, J. & DORNER, J. W. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **75**(2): 319-322, 1992a.
- URANO, T, ; TRUCKSESS, M.W. ; BEAVER, R.W. ; WILSON, D.M. ; DORNER, J.W. & DOWELL, F.E. Co-occurrence of cyclopiazonic acid and aflatoxins in corn and peanuts. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **75**(5): 838-841, 1992b.
- VISCONTI, A.; BOTTALICO, A. & SOLFRIZZO, M. Aflatoxin M₁ in milk, in Southern Italy. *Mycotoxin Research* **1**: 71-75, 1985.
- VOSS, K. A.; NORRRED, W. P.; HINTON, D. M.; COLE, R. J. & DORNER, J. W. Subchronic oral toxicity of cyclopiazonic acid (CPA) in male Sprague-Dawley rats. *Mycopathologia* **110**(1): 11-18, 1990.
- 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**(5): 1111-1113, 1974.
- WARE, G. M. High-pressure liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple butter. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **58**(4): 754-756, 1975.

- WATKINS, K. L.; FAZEKAS, G. & PALMER, M. V. Patulin in Australian apple juice. *Food Australia* 42(9): 438-439, 1990.
- WHEELER, J. L.; HARRISON, M. A. & KOEHLER, P. E. Presence and stability of patulin in pasteurized apple juice. *J. Food Sci.* 52(2): 479-480, 1987.
- WEHNER, F. C.; THIEL, P. G ; RENSBURG, S. J. van & DEMASIUS, P. C. Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins. *Mutation Res.* 58: 193-203, 1978.
- WIDIASTUTI, R. ; MARYAN, R. ; SALFINA ; BLANEY, B.J. & STOLTZ, D.R. Corn as a source of mycotoxins in Indonesian poultry feeds and the effectiveness of visual examination methods for detecting contamination. *Mycopathologia* 102(1): 45-49, 1988.
- WIDIASTUTI, R.; MARYAN, R.; BLANEY, B. J. SALFINA & STOLTZ, D. R. Cyclopiazonic acid in combination with aflatoxins, zearalenone and ochratoxin A in Indonesian corn. *Mycopathologia* 104(2): 153-156, 1989.
- WILSON, P. D. & NUOVO, G. J. Patulin production in apples decayed by *Penicillium expansum*. *Appl. Microbiol.* 26(1): 124-125, 1973.

WILSON, R. D. Surveying some apple juices for patulin. *Food Tech.*, New Zealand, **16**(6): 27-31, 1981.

WISEMAN, D. W.; APPLEB, D. W.; APPLEBAUM, R. S.; BRACKETT, R. E. & MARTH, E. H. Distribution and resistance to pasteurization of aflatoxin M₁ in naturally contaminated whole milk, cream and skin milk. *J. Food Prot.* **46**(6): 530-532, 1983.

WRIGHT, A. von & LINDROTH, S. The lack of mutagenic properties of patulin and patulin adducts formed with cysteine in *Salmonella* test systems. *Mutation Research* **58**(): 211-215, 1978.