

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

**ALTERNARIOL, ALTERNARIOL MONOMETIL ÉTER, ÁCIDO  
CICLOPIAZÔNICO E ÁCIDO TENUAZÔNICO EM PRODUTOS DE  
TOMATE**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por SILVANA DA MOTTA e aprovada pela Comissão Julgadora em 14.08.96.  
Campinas, 14 de agosto de 1996

*Lúcia Valente Soares*  
PROF<sup>a</sup>.DRA. LÚCIA M. VALENTE SOARES  
Presidente da Banca

**SILVANA DA MOTTA**

**FARMACÊUTICA-BIOQUÍMICA  
MESTRE EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**Prof.<sup>a</sup> Dra. LÚCIA MARIA VALENTE SOARES**  
**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, 1996

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	M858a
V.	Er
IMPRESO BC/	28.565
PROD.	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13/09/96
N.º CPD	CM.00071624-C

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

M858a

Motta, Silvana da

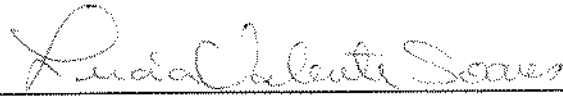
Alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico em produtos de tomate / Silvana da Motta.--  
Campinas, SP: [s.n.], 1996.

Orientador: Lúcia Maria Valente Soares

Tese (doutorado)-Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I.Alternariol. 2.Alternariol monometil éter. 3.Ácido ciclopiazônico. 4.Ácido tenuazônico. 5.Tomate. I.Soares, Lúcia Maria Valente. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



---

Profa. Dra. Lúcia Maria Valente Soares  
(orientadora)



---

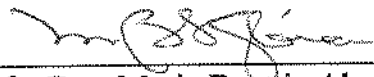
Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins  
(membro)

---

Profa. Dra. Heloisa Máscia Cecchi  
(membro)

---

Profa. Dra. Hilary Castle Menezes  
(membro)



---

Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Gloria  
(membro)



---

Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo  
(membro)



---

Dra. Myrna Sabino  
(membro)

Campinas, de agosto de 1996.

**À minha família**

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lúcia Maria Valente Soares pela orientação, apoio e amizade dedicados.

Ao Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia - UFMG pela permissão de afastamento.

À CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa recebida.

À FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo pelo suporte financeiro ao desenvolvimento do trabalho.

Aos professores, funcionários e amigos do Laboratório de Análise de Alimentos pelo apoio e convivência.

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

À todos que me apoiaram e incentivaram e que de alguma forma deram seu auxílio para a realização deste projeto.

## ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	1
2.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Ácido ciclopiazônico.....	3
2.1.1 Considerações gerais.....	3
2.1.2. Incidência e microorganismos produtores.....	4
2.1.3. Efeitos tóxicos.....	5
2.1.4. Metodologia analítica.....	7
2.1.4.1. Extração e limpeza.....	7
2.1.4.2. Cromatografia em camada delgada.....	8
2.1.4.3. Cromatografia gasosa.....	9
2.1.4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	10
2.1.4.5. Métodos colorimétricos.....	12
2.1.4.6. Imunoensaios e métodos microbiológicos.....	12

2.2. Ácido tenuazônico.....	13
2.2.1. Considerações gerais.....	13
2.2.2. Incidência e microorganismos produtores.....	14
2.2.3. Efeitos tóxicos.....	16
2.2.4. Metodologia analítica.....	17
2.2.4.1. Extração e limpeza.....	17
2.2.4.2. Cromatografia em camada delgada.....	18
2.2.4.3. Cromatografia gasosa.....	19
2.2.4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	20
2.3. Alternariol e alternariol monometil éter.....	23
2.3.1. Considerações gerais.....	23
2.3.2. Incidência e microorganismos produtores.....	24
2.3.3. Efeitos tóxicos.....	26
2.3.4. Metodologia analítica.....	28
2.3.4.1. Extração e limpeza.....	28
2.3.4.2. Cromatografia em camada delgada.....	28
2.3.4.3. Cromatografia gasosa.....	29
2.3.4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	30
3.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Reagentes, Solventes e Materiais diversos.....	33
3.2. Equipamento.....	33
3.3. Amostras.....	34

3.4. Padrões.....	36
3.4.1. Preparo das soluções estoque.....	36
3.4.2. Preparo das soluções de trabalho.....	36
3.5. Contaminação artificial das amostras de produtos de tomate.....	36
3.6. Testes de derivação química.....	37
3.6.1. Derivação com cloreto de dansila.....	37
3.6.2. Derivação com o 2,4 dinitrofenilhidrazina.....	37
3.6.3. Metilação usando o trifluoreto de boro como catalizador.....	38
3.7. Estudo da estabilidade dos padrões de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico frente a temperatura.....	38
3.8. Determinação das condições de trabalho no cromatógrafo à líquido para os padrões de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico.....	39
3.9. Desenvolvimento da metodologia analítica.....	41
3.9.1. Procedimentos propostos para extração e limpeza dos produtos de tomate na determinação de. alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico.....	41
3.9.2. Otimização dos procedimentos 14 e 15.....	51
3.9.2.1. Relação entre a quantidade de amostra e o volume de solvente extrator.....	51
3.9.2.2. Limpeza do extrato metanólico.....	51
3.9.2.3. Volume de clorofórmio usado na partição.....	51
3.9.2.4. Tempo de partição.....	51
3.9.2.5. Limpeza do extrato clorofórmico.....	52



3.9.3. Adequação das condições de trabalho no cromatógrafo à líquido para os extratos de produto de tomate.....	52
3.9.4. Métodos propostos.....	52
3.9.4.1. Procedimento para determinação de alternariol e alternariol monometil éter.....	52
3.9.4.2. Procedimento para determinação de ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico.....	53
3.10. Avaliação da metodologia.....	54
3.10.1. Robustez.....	54
3.10.2. Recuperação.....	57
3.10.3. Repetibilidade.....	58
3.10.3.1. Repetibilidade das amostras contaminadas artificialmente.....	58
3.10.3.2. Repetibilidade das amostras naturalmente contaminadas.....	58
3.10.4. Curvas Padrão.....	58
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1. Testes de derivação química.....	59
4.1.1. Derivação com o cloreto de dansila.....	59
4.1.2. Derivação com o 2,4 dinitrofenilhidrazina.....	60
4.1.3. Metilação usando trifluoreto de boro como catalizador.....	60
4.2. Estabilidade dos padrões de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico frente a temperatura.....	61
4.3. Desenvolvimento de metodologia para determinação de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico e por cromatografia à líquido.....	66
4.3.1. Extração e limpeza de produtos de tomate.....	66

4.3.2. Otimização dos procedimentos 14 e 15.....	66
4.3.2.1. Adequação da relação entre a quantidade de amostra e do volume de solvente extrator.....	67
4.3.2.2. Limpeza do extrato metanólico.....	67
4.3.2.3. Volume de clorofórmio usado na partição.....	68
4.3.2.4. Tempo de partição.....	68
4.3.2.5. Limpeza do extrato clorofórmico.....	68
4.3.3. Otimização das condições para eluição e detecção das toxinas em cromatografia à líquido.....	69
4.4. Avaliação da metodologia para determinação de alternariol e alternariol monometil éter por cromatografia à líquido.....	74
4.4.1. Robustez.....	74
4.4.2. Recuperação.....	78
4.4.3. Repetibilidade.....	83
4.4.4. Limite de detecção.....	84
4.4.5. Curva padrão.....	84
4.5. Avaliação da metodologia para determinação de ácido tenuazônico e ácido ciclopiazônico por cromatografia à líquido.....	87
4.5.1. Robustez.....	87
4.5.2. Recuperação.....	91
4.5.3. Repetibilidade.....	96
4.5.4. Limite de detecção.....	98
4.5.5. Curva padrão.....	98

4.6. Levantamento da incidência de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico em produtos de tomate comercializados na região de Campinas, S.P.....	101
5.0. CONCLUSÕES.....	117
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Determinação de ácido ciclopiazônico por cromatografia líquida de alta eficiência.....	11
Tabela 2. Determinação de ácido tenuazônico por cromatografia líquida de alta eficiência.....	22
Tabela 3. Determinação de alternariol e alternariol monometil éter por cromatografia líquida de alta eficiência.....	32
Tabela 4. Amostras de produtos de tomate adquiridas na cidade de Campinas, utilizadas para avaliar a incidência de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico.....	35
Tabela 5. Sistemas de fases móveis testados para determinação de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico em produtos de tomate.....	40
Tabela 6. Condições básicas e alternativas no teste de robustez para o método proposto para determinação de alternariol e alternariol monometil éter.....	55
Tabela 7. Condições básicas e alternativas no teste de robustez para o método proposto para determinação de ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico.....	56
Tabela 8. Efeito da concentração de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ sobre o tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) e fator de retenção ( $k$ ), mantendo-se constante o tipo de coluna, a polaridade e vazão da fase móvel.....	70
Tabela 9. Efeito da polaridade da fase móvel e o tamanho da coluna sobre o tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) e o fator de retenção ( $k$ ).....	72
Tabela 10. Efeito da vazão sobre o tempo de retenção ajustado( $t'_R$ ) e o fator de retenção ( $k$ ) mantendo-se fase móvel e coluna constantes.....	73
Tabela 11. Recuperação de alternariol nas condições do teste de robustez...	74
Tabela 12. Recuperação de alternariol monometil éter no teste de robustez..	75

Tabela 13. Individualização da influência das condições avaliadas para o alternariol no teste de robustez.....	76
Tabela 14. Individualização da influência das condições avaliadas para o alternariol monometil éter no teste de robustez.....	77
Tabela 15. Recuperação de alternariol e alternariol monometil éter pelo método proposto.....	82
Tabela 16. Faixa de linearidade e coeficiente de variação para alternariol e alternariol monometil éter.....	85
Tabela 17. Recuperação do ácido ciclopiazônico no teste de robustez.....	88
Tabela 18. Recuperação do ácido tenuazônico no teste de robustez.....	88
Tabela 19. Individualização da influência das condições avaliadas para o ácido ciclopiazônico no teste de robustez.....	89
Tabela 20. Individualização da influência das condições avaliadas para o ácido tenuazônico no teste de robustez.....	90
Tabela 21. Recuperação de ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico pelo método proposto.....	95
Tabela 22. Repetibilidade de amostras contaminadas naturalmente.....	97
Tabela 23. Faixa de linearidade e coeficiente de variação para os ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico.....	99
Tabela 24. Incidência de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico em amostras de polpa de tomate.....	115
Tabela 25. Incidência de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico em amostras de purê de tomate.....	116

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura química do ácido ciclopiazônico.....	3
Figura 2. Estrutura química do ácido tenuazônico.....	14
Figura 3. Estrutura química do alternariol monometil éter.....	23
Figura 4. Estrutura química do alternariol.....	24
Figura 5. Perfil cromatográfico do padrão de alternariol antes (A) após aquecimento (B) a 90°C por 30 min.....	62
Figura 6. Perfil cromatográfico do padrão de alternariol monometil éter antes (A) e após (B) aquecimento a 90°C por 30 min.....	63
Figura 7. Perfil cromatográfico do padrão de ácido ciclopiazônico antes (A) e depois (B) do tratamento térmico.....	64
Figura 8. Perfil cromatográfico do padrão de ácido tenuazônico antes (A) e depois (B) do tratamento térmico.....	65
Figura 9. Efeito da concentração de sal metálico ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) sobre os fatores de retenção dos padrões de alternariol monometil éter, ácido tenuazônico e ácido ciclopiazônico .....	71
Figura 10. Regressão linear para a recuperação do alternariol.....	80
Figura 11. Dispersão e desvios individuais da recuperação de alternariol....	80
Figura 12. Regressão linear para a recuperação do alternariol monometil éter.....	81
Figura 13. Dispersão e desvios individuais da recuperação de alternariol monometil éter.....	81
Figura 14. Curva padrão do alternariol monometil éter.....	86
Figura 15. Curva padrão do alternariol.....	86

Figura 16. Regressão linear da recuperação do ácido ciclopiazônico.....	92
Figura 17. Dispersão e desvios individuais da recuperação do ácido ciclopiazônico.....	92
Figura 18. Regressão linear para a recuperação do ácido tenuazônico.....	93
Figura 19. Dispersão e desvios individuais da recuperação do ácido tenuazônico.....	93
Figura 20. Curva padrão ácido ciclopiazônico.....	100
Figura 21. Curva padrão ácido tenuazônico.....	100
Figura 22. Perfil cromatográfico de uma amostra de produto de tomate não contaminada (A) e fortificada (B) com alternariol e alternariol monometil éter.....	103
Figura 23. Espectro no ultravioleta de alternariol monometil éter obtido do cromatograma de produto de tomate fortificado com o padrão.....	104
Figura 24. Espectro no ultravioleta de alternariol obtido do cromatograma de produto de tomate fortificado com o padrão.....	104
Figura 25. Perfil cromatográfico do padrão de alternariol monometil éter (A). Espectro no ultravioleta do padrão de alternariol monometil éter (B)....	105
Figura 26. Perfil cromatográfico do padrão de alternariol (A). Espectro no ultravioleta do padrão de alternariol (B).....	106
Figura 27. Perfil cromatográfico de uma amostra de produto de tomate não contaminada ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico (A) e contaminada (B) com ácido ciclopiazônico.....	107
Figura 28. Perfil cromatográfico do padrão do ácido ciclopiazônico (A). Espectro no ultravioleta do padrão do ácido ciclopiazônico (B).....	108
Figura 29. Espectro no ultravioleta do ácido ciclopiazônico obtido a partir do chromatograma (Figura 27-B) de produto de tomate contaminado (A). Espectro no ultravioleta do padrão do ácido ciclopiazônico de amostra fortificada (B).....	109
Figura 30. Perfil cromatográfico de uma amostra de produto de tomate contaminada com ácido tenuazônico.....	110

Figura 31. Perfil cromatográfico do padrão do ácido tenuazônico (A). Espectro no ultravioleta do padrão do ácido tenuazônico (B).....	111
Figure 32. Espectro no ultravioleta do ácido tenuazônico obtido a partir do chromatograma (Figura 24) de produto de tomate contaminado (A). Espectro no ultravioleta do ácido tenuazônico de amostra fortificada (B)....	112
Figura 33. Perfil cromatográfico de uma amostra de produto de tomate contaminada com ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico.....	113



## RESUMO

No presente trabalho foram desenvolvidos e avaliados dois métodos, sendo um para determinação de alternariol (AOH) e alternariol monometil éter (AME) e outro para determinação de ácido ciclopiazônico (CpA) e ácido tenuazônico (TeA), em produtos de tomate por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detector espectrofotométrico de arranjo de diodos para quantificação e confirmação da identidade das toxinas. No método para AOH e AME os limites de detecção foram de 5,0 e 2,0 ng/g e as recuperações médias foram de 84,1 e 98,7%, respectivamente. Os desvios padrões relativos de diferentes preparações da mesma amostra variou de 0,1 a 14,6% para AOH e de 0,2 a 1,8% para AME. No método para CpA e TeA os limites de detecção foram de 8,0 e 11,0 ng/g e as recuperações médias foram 75,7 e 83,3%, respectivamente. Os desvios padrões relativos de diferentes preparações da mesma amostra variou de 1,1 a 23,9% para TeA e de 3,9 a 20,0% CpA. Oitenta amostras de produtos de tomate foram adquiridas no comércio varejista de Campinas, S.P. e analisadas para as quatro toxinas empregando os métodos desenvolvidos. Onze marcas nacionais foram avaliadas e todas comercializadas a nível nacional. As amostras de suco de tomate (onze), extrato de tomate (vinte quatro) e tomates pelados (um) não apresentaram contaminação por nenhuma das quatro micotoxinas. Das 22 amostras de polpa de tomate, seis estavam contaminadas com CpA (64 a 178 ng/g) e sete estavam contaminadas com TeA (45 a 129 ng/g). Nas 22 amostras de purê de tomate a contaminação por TeA (34 a 88 ng/g) e CpA (37 a 117 ng/g) foi detectada em quatro e duas amostras, respectivamente. AME e AOH não foram detectados em nenhuma das amostras. A confirmação da identidade foi obtida pela comparação do espectro dos compostos puros com o espectro dos picos suspeitos na amostra.

## SUMMARY

In the present work two methods for the analysis of tomato products for mycotoxins were developed and evaluated. The first one aimed to determine alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME) and the second one cyclopiazonic acid (CpA) and tenuazonic acid (TeA) by liquid chromatography utilizing a diode array detector for quantitation and confirmation of identity of the toxins. In the method for AOH and AME the detection limits were 5.0 and 2.0 ng/g, the average recoveries were 84.1 and 98.7%, respectively. The relative standard deviations (RSDs) of different preparations of the same sample ranged from 0.1 to 14.6% for AOH and from 0.2 to 1.8% for AME. In the method for CpA and TeA the detection limits were 8.0 and 11.0 ng/g, the average recoveries were 75.7 and 83.3%, respectively. RSDs of different preparations of the same ranged from 1.1 to 23.9% for TeA and from 3.9 to 20.0% for CpA. Eighty samples of tomato products were acquired in retail outlets of Campinas, S.P. and analyzed for the four toxins employing the developed methods. Eleven domestic brands were included and all are sold nation wide. No toxin was detected in eleven samples of tomato juice, twenty-four samples of tomato paste and one sample of whole stewed tomatoes. Six out of twenty-two of tomato pulp contained CpA (64 to 178 ng/g) and seven contained TeA (45 to 129 ng/g). TeA (34 to 88ng/g) and CpA (37 to 117 ng/g) were detected in four and two samples of out of twenty-two samples of purée, respectively. No AME or AOH were detected in the samples. Confirmation was obtained by comparing the spectra of pure compounds with spectra of suspected peak in the sample.

## 1.0. INTRODUÇÃO

A contaminação de gêneros alimentícios por fungos pode ocorrer no campo, durante e após a colheita, no processamento, no transporte e na estocagem, pois os fungos estão amplamente distribuídos no solo e no meio ambiente. Além de representar considerável perda econômica, a proliferação de fungos nos vegetais pode significar um risco em potencial para homens e animais, por exposição aos metabólitos secundários tóxicos produzidos por estes microorganismos, as micotoxinas.

O ácido ciclopiazônico (CpA) é uma micotoxina produzida principalmente por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (HOLZAPFEL, 1968; LUK *et alii*, 1977). O ácido tenuazônico (TeA), o alternariol (AOH) e o alternariol monometil éter (AME) são considerados metabólitos do gênero *Alternaria* (MERONUCK *et alii*, 1972), apesar de terem sido isolados de outros fungos (IWASAKI *et alii*, 1972; STEYN & RABIE, 1976).

Estas micotoxinas são tóxicas para vegetais (MIKAMI *et alii*, 1971; UMETSU *et alii*, 1974; PERO & MAIN, 1970), animais (PURCHASE, 1971; DAVIS *et alii*, 1977; POLLOCK *et alii*, 1982; DORNER *et alii*, 1983; LOMAX *et alii*, 1984; NUEHRING *et alii*, 1985) e existem relatos da sua toxicidade para humanos (STEYN & RABIE, 1976; RAO & HUSAIN, 1985). Também é importante salientar que a associação de diferentes micotoxinas pode resultar em sinergia, aumentando o efeito tóxico além daquele esperado da simples somatória das toxinas presentes. (GIAMBRONE *et alii*, 1978).

A presença de fungos e de seus metabólitos tóxicos tem sido extensivamente relatada em alimentos e rações animais. Dentre os vegetais passíveis de contaminação, estão os tomates que são altamente susceptíveis à invasão fúngica, principalmente nas regiões de rompimento da pele ou tecidos injuriados do fruto (AYRES *et alii*, 1964; PEARSON & HALL, 1975). Estas lesões podem ocorrer no campo, durante o

armazenamento, transporte e manipulação industrial (MOSS, 1984). Deve-se considerar também, a possibilidade de utilização de tomates parcialmente mofados no processamento de diversos produtos (BANDLER *et alii*, 1987).

Mesmo conhecendo-se a toxicidade e os mecanismos de contaminação e proliferação dos fungos produtores de AME, AOH e TeA, poucos trabalhos foram feitos para avaliar a presença destas micotoxinas em produtos de tomate (SCOTT & KANHERE, 1980; STACK *et alii*, 1985). No caso de CpA, nenhum trabalho é conhecido que tenha abordado esta toxina em tomate ou seus produtos. No Brasil nenhum levantamento da presença de AME, AOH e TeA em tomates e seus produtos foi ainda realizado. Na realidade AME, AOH e TeA ainda não foram estudadas, sob nenhum aspecto no Brasil, sendo que apenas o CpA foi analisado em amendoim e milho.

A determinação da incidência de micotoxinas em alimentos e rações permite que se possa prevenir e controlar a contaminação de produtos susceptíveis. Desta forma e pensando na confiabilidade dos resultados, estudos são necessários visando desenvolver e avaliar métodos para a detecção e quantificação das micotoxinas.

Tendo em vista estas considerações os objetivos estabelecidos para o presente trabalho foram:

1. Desenvolvimento de metodologia analítica para a detecção e quantificação de AOH, AME, CpA e TeA em produtos de tomate.
2. Avaliar a metodologia analítica desenvolvida
3. Verificar a incidência de AOH, AME, CpA e TeA em produtos de tomate oferecidos ao consumidor.

## 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Ácido ciclopiazônico

#### 2.1.1. Considerações gerais

O ácido ciclopiazônico (CpA) (Figura 1) é um metabólito secundário, sintetizado a partir de triptofano e do íon acetato (HOLZAPFEL & WILKINS, 1971). O espectro de absorção do CpA no ultravioleta apresenta os seguintes  $\lambda_{\text{max}}$  em etanol: 223 ( $\epsilon$  39400), 277 ( $\epsilon$  18400), 281 ( $\epsilon$  19300) e 290 nm ( $\epsilon$  15600) (LUK *et alii*, 1977).

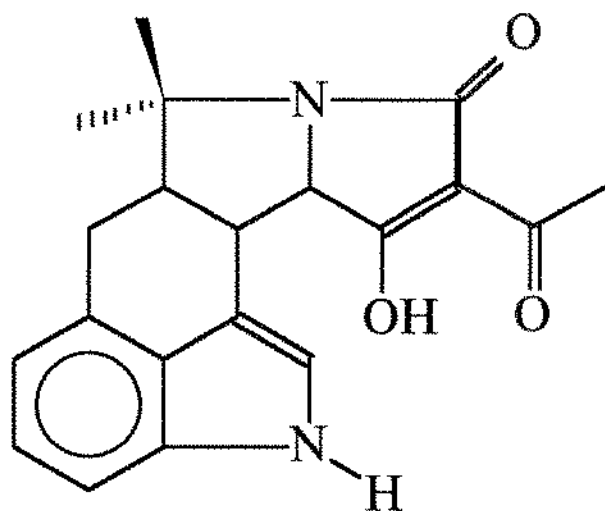


Figura 1. Estrutura química do ácido ciclopiazônico.

### 2.1.2. Incidência e microorganismos produtores

O ácido ciclopiazônico é produzido por fungos dos gêneros *Penicillium* (HOLZAPFEL, 1968; LE BARS, 1979a; PETERSON *et alii*, 1989) e *Aspergillus* (ORTH, 1977; LUK *et alii*, 1977; DORNER *et alii*, 1983). Estudos realizados com diferentes cepas de *Aspergillus flavus* demonstraram que o CpA pode ocorrer com uma frequência similar ou maior do que a aflatoxina e que as duas substâncias podem ser produzidas por um mesmo fungo (GALLAGHER *et alii*, 1978; LANSDEN & DAVIDSON, 1983). Os resultados obtidos sugeriram a possibilidade dos seres humanos e animais estarem expostos simultaneamente à aflatoxina e ao CpA.

Fungos produtores de CpA foram isolados a partir de diversos produtos. LUK *et alii* (1977) relataram pela primeira vez a produção de ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* Link. O fungo da espécie *Aspergillus oryzae*, por sua vez, desempenha importante papel na indústria de alimentos, devido a sua capacidade de produzir consideráveis quantidades de enzimas amilolíticas, proteolíticas e lipolíticas. Em um estudo com 16 cepas de *Aspergillus oryzae* usadas na indústria de alimentos, foi demonstrado que 8 cepas produziavam o ácido ciclopiazônico. CVETNIC (1994) isolou fungos do gênero *Aspergillus* de 150 amostras de grãos de feijão e de 90 amostras de milho, sendo que dois dos 27 isolados de *Aspergillus flavus* foram capazes de produzir ácido ciclopiazônico na faixa de 25 a 36 µg/g.

A produção de diferentes tipos de queijo requer diferentes cepas de *Penicillium* o que leva a uma grande variedade de metabólitos secundários. LE BARS (1979a) observou o efeito da temperatura sobre cepas de *P. camembertii* Thom e concluiu que a toxicidade pode ser alterada dependendo da temperatura de estocagem. Por outro lado, fungos usados na produção de queijo branco, classificados como *P. camemberti*, mostraram capacidade de produzir CpA (PITT *et alii*, 1986). Duas cepas de *Penicillium camembertii* foram submetidas a mutações o que provocou a perda total ou parcial da capacidade de produzir ácido ciclopiazônico (GEISEN *et alii*, 1990).

LUND *et alii* (1995) fizeram análise microbiológica de queijos provenientes de diversos países da Europa, dentre eles Dinamarca, França, Grécia e Reino Unido. Estes pesquisadores isolaram 371 cepas, sendo que 90% eram da espécie *Penicillium*, mas apenas uma cepa de *P. commune* produziu o CpA.

A micotoxina CpA tem sido encontrada em vários alimentos tais como milho, queijo, amendoim e pãoço (GALLAGHER *et alii*, 1978; LE BARS, 1979b; LANSDEN, 1984; RAO & HUSAIN, 1985). GALLAGHER *et alii* (1978) relataram pela primeira vez a ocorrência de CpA em amostras de milho contaminadas com aflatoxina. Na França, LE BARS (1979b) determinou o CpA em casca de queijo tipo “camembert”, na faixa de 50 a 1500 µg/kg.

Em amostras de amendoim com e sem casca foi detectado o CpA na faixa de 32 a 6525 µg/kg (LANSDEN & DAVIDSON, 1983). Também foi relatado por URANO *et alii* (1992) a presença de CpA em amostras de amendoim e milho. Aflatoxinas também estavam presentes nas amostras contaminadas.

WIDIASTUTI *et alii* (1988) encontraram CpA em amostras de milho da Indonésia, com teores variando entre 30 e 9220 µg/kg. Todas as amostras contaminadas continham aflatoxinas, sendo que algumas apresentavam também zearalenona e ocratoxina. Em Trindade, CHANG-YEN & DIBASE (1990) determinaram o CpA em amostras de milho e rações mofadas na faixa de 1000 a 4000 µg/kg. Foi relatado por BRADBURN *et alii* (1994) a presença de CpA (concentração de 31 µg/kg) na torta de amendoim envolvida na doença “X” dos perus na Inglaterra em 1960.

### 2.1.3. Efeitos tóxicos

A toxicidade do CpA foi demonstrada experimentalmente em várias espécies animais, incluindo roedores (PURCHASE, 1971; VAN RESBURG, 1984), aves (DORNER *et alii*, 1983; CULLEN *et alii*, 1988; SMITH *et alii*, 1992), cachorros

(NUEHRING *et alii*, 1985) e porcos (LOMAX *et alii*, 1984). Foram observados sintomas tais como perda de peso, diarreia, depressão, convulsão e morte, além de lesões histológicas, principalmente degeneração e necrose nos músculos e vísceras. Os principais órgãos afetados foram o fígado, os rins e o sistema digestivo. Presentemente existe controversia sobre a mutagenicidade do CpA. WEHNER *et alii* (1978) observaram que a toxina não era mutagênica para *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100, mas SORENSON *et alii* (1984) verificaram que o CpA era mutagênico para *Salmonella typhimurium* TA98, pelo teste de AMES.

O CpA é uma toxina com efeito tóxico agudo. A dose letal suficiente para matar 50% de uma população (DL-50) de ratos, via intraperitoneal, é de 2,3 mg/kg de peso corpóreo (kg p.c). A DL-50 por via oral, foi de 36 mg/kg p.c. para machos e 63 mg/kg p.c. para fêmeas. A diferença nas respostas pode ser explicada pela formação de composto insolúvel na administração via oral devido a acidez do estômago, o que não ocorre por via intraperitoneal (PURCHASE, 1971). Para a aflatoxina B<sub>1</sub>, a DL-50, para camundongos, foi de 40 mg/kg p.c. (BUSBY Jr & WOGAN, 1981).

Em estudos sobre ingestão, distribuição e excreção de CpA em ratos, foi verificado o elevado grau de distribuição da micotoxina no músculo esquelético, após administração oral ou parenteral (NORRED *et alii*, 1985). Na determinação dos níveis de CpA em carnes de aves que receberam a substância, ficou demonstrado que a quantidade dependia da dose recebida e do tempo decorrido entre a administração e o sacrifício do animal (NORRED *et alii*, 1988). Assumindo que a distribuição do CpA em animais para consumo humano que ingeriram rações contaminadas com a toxina ocorra de forma similar, então os seres humanos estariam mais expostos à toxina através do consumo de carnes.

DORNER *et alii* (1994) detectaram a presença de CpA no leite proveniente de ovelhas e nos ovos de galinhas que receberam a ração via oral em cápsulas de gelatina. No leite foi atingida a maior concentração 48 horas após a ingestão, sendo que no nono dia não foi detectada a presença de CpA. Nos ovos foi observado que a concentração



de CpA foi muito maior na clara do que na gema, aproximadamente de 100 e 10 ng/g, respectivamente. A ocorrência de CpA em leite e ovos é um motivo de preocupação para os consumidores, principalmente em regiões onde os animais podem estar expostos a rações contaminadas com quantidades significativas da toxina. O potencial de contaminação natural em produtos agrícolas parece ser elevado considerando o número de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* capazes de produzirem CpA. Está claro, a partir dos resultados deste estudo, que leite e ovos constituem uma fonte de ingestão desta toxina pelo homem.

RAO & HUSAIN (1985) associaram a síndrome "Kodua poisoning" em animais e seres humanos, com a presença de CpA em sementes de "kodo millet" (*Paspalum scobriculatum*) contaminadas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus tamarii* de determinadas regiões da Índia.

Os relatos sobre a etiologia da clássica síndrome da doença "X" dos peruzinhos (a morte de 100.000 peruzinhos foi atribuída a contaminação por aflatoxina de torta de amendoim proveniente do Brasil, na Inglaterra em 1960) foram revistos por COLE (1986). A análise dos sintomas clínicos descritos na época, indicou que alguns deles não eram característicos de aflatoxicose, podendo ser atribuídos a presença de CpA que pode ser produzido pelo *Aspergillus flavus*.

#### 2.1.4. Metodologia analítica

##### 2.1.4.1. Extração e limpeza

Os métodos propostos para determinação de CpA, como os de muitas outras toxinas presentes em alimentos, envolvem etapas de extração e de limpeza. A mistura clorofórmio/metanol foi utilizada para extrair o CpA da casca de queijos, sendo que a remoção dos interferentes foi feita com solução de acetato de chumbo e o desengorduramento com hexano (LE BARS, 1979b). Para amostras de amendoim também foi feita extração empregando a mistura clorofórmio/metanol, após a amostra

ter sido previamente desengordurada. Os interferentes foram removidos por partição com solução aquosa de bicarbonato de sódio seguida por acidificação e nova partição com clorofórmio (LANSDEN & DAVIDSON, 1983).

Amostras de carne de frango, alimentados com ração contaminada com CpA, foram extraídas com clorofórmio/metanol. Para a remoção dos interferentes foi empregada coluna de sílica gel (NORRED *et alii*, 1987). Cartuchos Sep-Pak foram utilizados na remoção de interferentes presentes em extratos de milho, arroz e farinha desengordurada de amendoim (GOTO *et alii* 1987). URANO *et alii* (1992) também removeram os interferentes com cartucho Sep-Pak após extração das amostras de amendoim e milho com uma mistura de metanol/bicarbonato de sódio 2% (7:3, v/v).

#### 2.1.4.2. Cromatografia em camada delgada

Cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada para a determinação de CpA em amostras de milho (GALLAGHER *et alii*, 1978), queijos (LE BARS, 1979b) e amendoim (LANSDEN & DAVIDSON, 1983). A quantificação foi feita em placas de sílica gel, por comparação visual com padrão. A confirmação foi realizada através de reação com p-dimetilaminobenzaldeído (reagente Ehrlich), originando uma mancha de cor violeta. Além do reagente de Ehrlich, o cloreto férrico também foi utilizado como revelador originando uma mancha de cor laranja avermelhada (GALLAGHER *et alii*, 1978; FILTERBORG *et alii*, 1983).

O adsorvente mais utilizado para a determinação de CpA por CCD tem sido a sílica gel com indicador de fluorescência (LE BARS, 1979b; DORNER, 1983) e sem indicador de fluorescência (GALLAGHER *et alii*, 1978; FILTERBORG *et alii*, 1983). As placas podem ser impregnadas com ácido oxálico ou tartártico (GALLAGHER *et alii*, 1978, LE BARS, 1979b; TRUCKSESS *et alii*, 1987), o que aumenta a mobilidade da toxina. As fases móveis utilizadas são combinações de tolueno/acetato de etila/ácido fórmico concentrado (5:4:1, v/v/v) (DORNER, 1983); clorofórmio/isobutilmetilcetona (4:1, v/v) (FILTERBORG *et alii*, 1983);

clorofórmio/acetona (95:5,v/v); acetato de etila/2-propanol/NH<sub>4</sub>OH (20:15:10,v/v/v) (LE BARS, 1979b) e benzeno/ácido acético glacial/metanol (90:5:7,v/v/v) (TRUCKSESS *et alii*, 1987).

A técnica da cromatografia bidimensional usando placas de sílica gel foi empregada por POPKEN & DOSE (1983) e WIDIASTUTI *et alii* (1988) na determinação de CpA em produtos vegetais e amostras de milho, respectivamente.

A quantificação do CpA em CCD foi feita por comparação visual (WIDIASTUTI *et alii* 1988) ou por densitômetros (LANSDEN, 1986). LE BARS (1979b) relatou um limite de detecção para o CpA de 20 µg/kg para amostras de queijo, sendo que foi descrito por LANSDEN & DAVIDSON (1983) um limite de 32 µg/kg para amostras de amendoim, utilizando a comparação visual. Um limite de detecção de 25 ng foi registrado por LANSDEN (1986) para amostras de milho e amendoim que utilizou a quantificação por densitômetro.

Considerando a possibilidade das amostras estarem contaminadas, simultaneamente com diferentes micotoxinas, STEYN (1969) e GORST-ALLMAN & STEYN (1979) sugeriram procedimentos de detecção por CCD para micotoxinas importantes, incluindo CpA. WIDIASTUTI *et alii* (1988), por sua vez, chegaram a detectar CpA, aflatoxina, zearalenona e ocratoxina em amostras de milho por CCD.

#### 2.1.4.3. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa (CG) tem sido pouco empregada na determinação de CpA. GOTO *et alii* (1990) determinaram CpA e outras micotoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* por CG sem derivação química, utilizando coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária DB-5 (0,25 mm X 10 m), injetor "on-column" e detector por ionização em chama. O limite de detecção para CpA foi de 0,5 ng. A confirmação foi realizada por espectrometria de massas.

#### 2.1.4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A quantificação de CpA pode ser feita por cromatografia líquida de alta eficiência (Tabela 1 ). LANSDEN (1984) quantificou CpA em amostras de milho e amendoim, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna de fase reversa ( $C_{18}$ ) e detecção no ultravioleta a 284 nm. A fase móvel era composta por uma mistura de acetonitrilo (40%), isopropanol (30%), água (20%) e solução de acetato de zinco 0,01M (10%) contendo 10% de acetato de amônia e 0,25% de 4-dodecildietilenotriamina. Estas mesmas condições cromatográficas foram utilizadas por NORRED (1987) para amostras de carne de frango e o limite de detecção foi de 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Cartucho Sep-Pak de sílica foi utilizado para a remoção dos interferentes de extrato de milho. A coluna analítica empregada foi de sílica (fase normal) e como fase móvel utilizou-se a mistura de solventes acetato de etila/2-propanol/solução de amônia a 25% (55:20:5, v/v/v). Com detector no ultravioleta a 284 nm, conseguiram um limite de detecção de 0,2 ng (GOTO *et alii*, 1987).

Para amostras de amendoim e milho, URANO *et alii* (1992) também quantificaram CpA por CLAE, mas usando coluna de fase reversa ( $C_{18}$ ) e gradiente linear 0-4 mM de sulfato de zinco em metanol a 85%. A detecção foi realizada pela absorvância do CpA no ultravioleta a 279 nm, sendo obtidos limites de detecção de 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para amendoim e milho, respectivamente.

Tabela 1 . Determinação de ácido ciclopiazônico por cromatografia líquida de alta eficiência.

Produto	Coluna	Fase móvel	Detector	Referência
amendoim	FR C <sub>8</sub> e C <sub>18</sub>	40% acetonitrilo/ 30% isopropanol/ 20% água/ 10% acetato de zinco 0,01M contendo 10% acetato de amônia e 0,25% 4-dode- cildietilenotriamina	U.V.(284 nm)	LANSDEN (1984)
carne de ave	FR C <sub>8</sub>	40% acetonitrilo/ 30% isopropanol/ 20% água/ 10% acetato de zinco 0,01M contendo 10% acetato de amônia e 0,25% 4-dode- cildietilenotriamina	U.V.(284 nm)	NORRED (1987)
milho/arroz/ farinha desengordurada de amendoim	FN Sílica	Acetato de etila/ 2-propanol/ amônia 25% (55:20:5, v/v/v)	U.V. (284 nm)	GOTO <i>et alii</i> (1987)
milho/amendoim	FR C <sub>18</sub>	A-Metanol/água (85:15, v/v)  B- Metanol/água 4mM ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (gradiente)	U.V. (279 nm)	URANO <i>et alii</i> (1992)

FN= fase normal, FR= fase reversa, U.V.= ultravioleta

#### 2.1.4.5. Métodos Colorimétricos

Métodos colorimétricos têm sido desenvolvidos e baseiam-se na reação do CpA com reagente de Erlich (p-dimetilaminobenzaldeído) e detecção a 560 nm. RATHINAVELU & SHANMUGASUDARAM (1984) desenvolveram método colorimétrico para análise de CPA em produtos agrícolas infectados por *Penicillium cyclopium*. A micotoxina foi extraída com clorofórmio seguida por separação em CCD. Após a separação foi utilizado um reagente cromogênico e a mancha raspada e diluída em metanol. A reação obedece a lei de Beer entre 5 e 50 µg/mL e a cor é estável por 30 minutos. As condições foram otimizadas em relação a rapidez (RAO & HUSAIN, 1987), concentração de reagentes utilizados e tempo de reação (CHANG-YEN & BIDASE, 1990).

O CpA foi determinado espectrofotometricamente em rações e milho pelo mesmo método colorimétrico acima (CHANG-YEN & BIDASE, 1990). Os procedimentos utilizados na extração e limpeza foram os mesmos aplicados por NORRED *et alii* (1987). A faixa linear da curva ficou entre 5 e 100 µg/mL e o limite de detecção foi de 80 µg/kg.

#### 2.1.4.6. Imunoensaios e Métodos Microbiológicos

Imunoensaios são métodos baseados na interação entre a micotoxina e um anticorpo, geralmente produzidos em coelhos pela injeção da toxina homóloga. Para que desenvolvam atividade imunizante as micotoxinas necessitam ser conjugadas a um polipeptídeo ou proteína.

Um dos tipos de imunoensaio empregados para o CpA é o ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), que baseia-se na ligação entre a toxina livre e um sítio específico da molécula do anticorpo. HAHNAU & WEILER (1991) desenvolveram um imunoensaio (ELISA) com boa seletividade e com limite de detecção de 30 pg a 2

ng. A técnica permite monitoramento de isolados de fungos possíveis produtores de CpA.

O método de ELISA indireto, utilizando anticorpos mono e policlonais para o CpA, foi relatado por HUANG & CHU (1993). Um ensaio com anticorpos monoclonais permite a análise da CpA em amostras de queijo fermentado por fungos brancos (HAHNAU & WEILER, 1993).

Técnicas microbiológicas têm sido usadas para confirmar e identificar a presença de micotoxinas. Estas são mais baratas em comparação com métodos biológicos e requerem um tempo menor para obtenção do resultado. Os métodos microbiológicos foram desenvolvidos considerando a toxicidade do CpA para fungos, leveduras e bactérias.

A bactéria *Bacillus brevis* foi utilizada em ensaio de difusão de disco e a menor quantidade detectada foi de 0,5 µg por disco (MADHYASTHA *et alii*, 1994). Para a levedura *Kluyveromyces marxianus*, uma quantidade de 200 µg/disco de CpA não foi capaz de inibir a bactéria, mas concentrações de 0,005 a 50 µg/disco de tricotecenos foram inibitórias.

## 2.2. Ácido Tenuazônico

### 2.2.1. Considerações gerais

As micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Alternaria* pertencem a três classes estruturais diferentes, a saber: dibenzopirenos, altertoxinas e derivados do ácido tetrâmico. O ácido tenuazônico (TeA), um derivado do ácido tetrâmico, teve a sua estrutura definida como ácido 3-acetil-5-secbutil tetrâmico (STICKINGS, 1959), (Figura 2).. O espectro do TeA no ultravioleta apresenta dois  $\lambda_{\max}$  um a 240 ( $\epsilon$  13100) e outro a 279 nm ( $\epsilon$  17900) (UMETSU *et alii*, 1972; 1973; 1974).

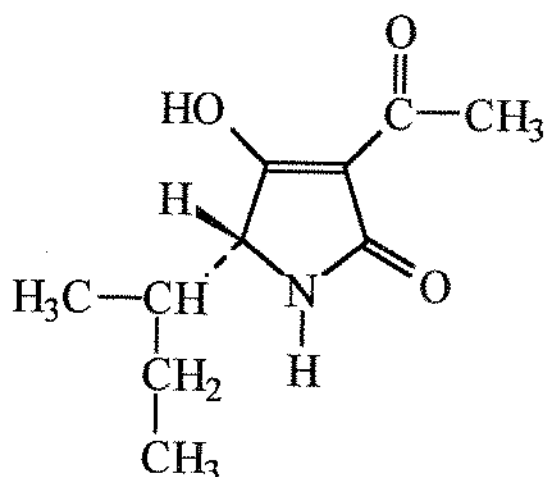


Figura 2. Estrutura química do ácido tenuazônico.

### 2.2.2. Incidência e microorganismos produtores

O TeA é sintetizado por fungos a partir de L-isoleucina e dicetona (HARRIS *et alii*, 1965). Foi isolado de culturas de *Pyricularia oryzae* (IWASAKI *et alii*, 1972), *Alternaria kikuchiana*, *Alternaria mali*, *Alternaria citri*, *Alternaria japonica*, *Alternaria oryzae* (KINOSHITA *et alii*, 1972), *Alternaria alternata* (MERONUCK *et alii*, 1972), *Phoma sorghina* (STEYN & RABIE, 1976), *Alternaria tenuissima* (DAVIS *et alii*, 1977), *Alternaria raphani*, *Alternaria cheiranthi*, *Alternaria brassicae* e *Penicillium infectoria* (BRUCE *et alii*, 1984).

O potencial de contaminação por TeA em frutos, tais como maçã, tomate, laranja, limão e mirtilo ("blueberry"), foi estabelecido pelo crescimento de *Alternaria* e produção da toxina nestes alimentos em escala laboratorial (STINSON *et alii*, 1980, 1981). Níveis de TeA em material cultivado, são geralmente considerados maiores do que aqueles encontrados nas amostras contaminadas naturalmente (SCOTT & KANHERE, 1980). STINSON *et alii* (1981) demonstraram pela primeira vez a produção de TeA em tomates, maçãs e laranjas infectados por *Alternaria* nativa. A



espécie *Alternaria tenuis* foi relatada como sendo a principal responsável pela decomposição pós-colheita de maçãs, sendo que das 110 cepas isoladas apenas uma produziu TeA (VIÑAS *et alii*, 1992).

Além das frutas, outros produtos agrícolas podem estar contaminados por *Alternaria*. DAVIS *et alii* (1977) isolaram culturas de *A. alternata* e *A. tenuissima* de sementes de algodão e suas cascas. Um levantamento feito com 230 amostras de grãos de cereais (148 de trigo, 57 de cevada e 25 de centeio) nos EUA, propiciou o isolamento de nove cepas de diferentes espécies de *Alternaria* dentre as quais oito produziram TeA. Dentre as espécies isoladas, *A. raphani*, *A. cheiranthi*, *P. infectoria* e *A. brassicae* foram citadas pela primeira vez como produtoras de TeA. É importante salientar que as espécies foram detectadas após a desinfecção superficial dos grãos, indicando penetração, crescimento e possível produção de toxina (BRUCE *et alii*, 1984).

SANCHIS *et alii* (1993) determinaram que as espécies predominantes de fungos em 60 amostras de cevadas coletadas na Espanha eram *Alternaria alternata*, *Penicillium* sp. e *Aspergillus flavus*. Dos 176 isolados de *Alternaria* examinados, 88,6% foram capazes de produzir TeA.

O gênero *Alternaria* é o principal invasor de tomates, sendo capaz de produzir o metabólito tóxico, o TeA, no tecido de tomates frescos (HARWIG *et alii*, 1979). A presença de TeA em produtos de tomate (SCOTT & KANHERE, 1980) e tomates naturalmente infectados (STINSON *et alii*, 1981) foi reportada com níveis inferiores a 1 mg/kg de produto. MISLIVEC *et alii* (1987) determinaram os tipos de fungos presentes em 146 amostras de tomates visivelmente mofados, coletados nas linhas de processamento de indústrias de ketchup. Foram encontrados 22 gêneros, sendo os principais *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium*. Apesar de 50% das amostras analisadas apresentarem TeA (0,4 a 69,7 µg/g), apenas 26% foram positivas para *Alternaria* sp. Isso sugeriu que outros fungos produziram TeA ou que a *Alternaria* produtora da toxina não estava viável na época da amostragem. A presença

de TeA em produtos de tomate processados pode ser um indicativo do uso matéria prima contaminada com fungo.

### 2.2.3. Efeitos tóxicos

Inicialmente, o TeA foi estudado não por contaminar alimentos, mas devido a sua possível utilização no tratamento de câncer. KACZKA *et alii* (1964) isolaram e identificaram o TeA a partir de isolado de *Alternaria tenuis* e observaram que exibia significativo efeito anti-tumor em ovos embrionados. GITTERMAN *et alii* (1965) reportaram que o tenuazonato de sódio inibiu o crescimento de adenocarcinoma humano em ovos embrionados, ficando demonstrado o seu potencial anti-tumor. Todos os isômeros do TeA demonstraram atividade antibacteriana.

SMITH *et alii* (1968) demonstraram que o tenuazonato de sódio produziu hemorragia em órgãos vitais, principalmente no trato gastrointestinal de animais tratados com a substância. Os valores de DL-50, via oral, foram 81 e 186 mg/kg p.c. para camundongos fêmea e macho, respectivamente. Os sais de cálcio e magnésio do TeA, isolados do fungo *Phoma sorghina*, foram apontados como possíveis causadores ou fatores contribuidores de uma disfunção hematológica em humanos, denominada "onyalai", registrada na África (STEYN & RABIE, 1976).

DAVIS *et alii* (1977) reportaram ser o TeA tóxico para embrião de frango e causador de grave hemorragia e morte em camundongos jovens. Também foi observado que o ácido livre do TeA causou hemorragia gastro-intestinal em ratos alimentados por vários dias com ração contendo 145 e 370 mg de TeA/kg. Os casos de óbito ocorreram a partir do nono até o vigésimo dia de dieta (SAUER *et alii*, 1978). Mas, GIAMBRONE *et alii* (1978) observaram apenas lesões no intestino, baço, coração e músculo de frangos jovens que receberam dieta contendo 10 µg de TeA/g de ração, sem nenhuma mortalidade. Comparando as dosagens utilizadas nos experimentos, foi sugerido que os pintinhos eram menos tolerantes que os ratos e camundongos ao TeA. Entretanto, nenhum efeito patológico foi observado em ratos

tratados com 29 mg de TeA/kg de ração, por um período de três semanas (SAUER *et alii*, 1978). Apesar do TeA ser considerado tóxico para mamíferos, não foram observados efeitos mutagênicos (SCOTT & STOLZ, 1980) e teratogênicos (GRIFFIN & CHU, 1983).

O efeito fitotóxico do TeA foi demonstrado ao se isolar fungos produtores desta micotoxina (*Alternaria longipes*) e a própria substância em plantas de tabaco (MIKAMI *et alii*, 1971) e de arroz doentes (UMETSU *et alii*, 1972, 1973, 1974). O TeA também não foi encontrado em amostras de sorgo e grãos de soja infectados por *Alternaria* (MERONUCK *et alii*, 1972; SAUER *et alii*, 1978). LE BRUN *et alii* (1988) demonstraram que o TeA produzido por fungo patogênico do arroz (*Pyricularia oryzae*) inibiu o crescimento de plantas, interferindo na síntese de proteína.

#### 2.2.4. Metodologia analítica

##### 2.2.4.1. Extração e limpeza

Os métodos de extração do TeA, encontrados na literatura, variam grandemente quanto aos solventes empregados. Em alguns métodos foi feita simplesmente a extração com um solvente orgânico, tal como metanol (BRUCE *et alii*, 1984), clorofórmio (MISLIVEC *et alii*, 1987) e acetato de etila (GRIFFIN & CHU, 1983).

DAVIS *et alii* (1977) usaram uma mistura de clorofórmio/metanol/ácido fórmico concentrado (94:3:3) na extração de TeA de meios de cultura. A limpeza do extrato foi realizada pela partição da fase orgânica com uma solução de bicarbonato de sódio a 5%, seguida pela acidificação da fase aquosa com ácido clorídrico e partição com hexano. Na extração de produtos vegetais, HEISLER *et alii* (1980) usaram a mistura clorofórmio/etanol (4:1), etapas de partição com bicarbonato de sódio e partição com clorofórmio. No método proposto por STINSON *et alii* (1981), primeiro a amostra foi acidificada com ácido clorídrico seguida por extração com uma mistura clorofórmio/metanol (4:1).

Solventes menos polares, como o benzeno, também foram usados na extração, sendo que foram mantidas as etapas de partição com bicarbonato de sódio a 5% e partição com éter de petróleo, após acidificação (KINOSHITA *et alii*, 1972).

Produtos de tomate foram extraídos com uma mistura metanol/hexano. Após centrifugação, a camada de metanol foi acidificada com ácido sulfúrico. A partição foi feita com diclorometano seguida de uma segunda partição com bicarbonato de sódio a 5%. Uma nova acidificação e partição com diclorometano foram executadas (SCOTT & KANHERE, 1980). Para o mesmo tipo de amostra, STACK *et alii* (1985) usaram uma mistura de água/clorofórmio (450:100, v/v) para extração e limpeza do extrato em coluna de sílica, tendo como eluentes a seguinte sequência de solventes: clorofórmio, clorofórmio/metanol (9:1, v/v) e metanol com 300 mg  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O/L$ . A coluna de sílica gel também foi usada por MÜLLER & LEPOM (1992) para purificar o extrato.

A mistura metanol/água/n-hexano/ácido clorídrico 37% m/v(45:40:40:1, v/v/v/v) foi empregada na extração de amostras de sorgo. O extrato foi centrifugado e a camada de hexano descartada. A camada polar foi submetida a uma partição com clorofórmio (ANSARI & SHRIVASTAVA, 1990).

#### 2.2.4.2. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada para a determinação quantitativa de TeA tendo a sílica gel como fase estacionária (REIB, 1983). Em alguns casos as placas foram impregnadas com ácido oxálico (MÜLLER & LEPOM, 1992). Para desenvolvimento, a fase móvel tolueno/acetato de etila/ácido fórmico 90% (5:4:1 ou 6:3:1, v/v/v) foi usada com mais frequência (SCHROEDER & COLE, 1977; REIB, 1983).

ANSARI & SHRIVASTVA (1990) determinaram o TeA em amostras de sorgo indiano usando CCD bidimensional em placas de sílica gel com as seguintes fases móveis, clorofórmio/acetona (88:12, v/v) e tolueno/acetato de etila/ ácido fórmico 90%

(60:30:10). A confirmação foi feita por comparação dos espectros ultravioleta do padrão e da toxina extraída.

A revelação do TeA foi realizada com 2,4-dinitrofenilhidrazina, sulfato cérico (STEYN & RABIE, 1976), cloreto férrico (DAVIS *et alii*, 1977; REIB, 1983), ácido anisaldeído e radiação ultravioleta (SCOTT & KANHERE, 1980).

### 2.2.4.3. Cromatografia Gasosa

A derivação foi necessária na determinação de TeA por cromatografia gasosa (CG), efetuada previamente ao processo cromatográfico. A derivação utilizada foi do tipo silanização, que consiste na substituição do hidrogênio de certos grupos funcionais, tais como hidroxilas em álcoois e ácidos e/ou fenóis, por radicais do tipo trimetilsilil [ $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ].

HARVAN & PERO (1974) utilizaram cromatografia gasosa com detector de ionização de chama para analisar o derivado trimetilsilano do TeA. A coluna usada foi empacotada com 3% OV-17 sobre Gas Chrom Q (100-200#), a temperatura do forno foi programada de 100 a 250°C numa razão de 8°/min e a temperatura do injetor e do detector era 300°C. SAUER *et alii* (1978) empregando condições cromatográficas semelhantes, compararam as separações obtidas por 2 tipos diferentes de coluna com OV-17 ou OV-101 e observaram que a coluna de OV-101 minimizou as interferências presentes na análise de amostras de grão de sorgo.

Na determinação de TeA a partir de fungos isolados de tomates em decomposição, HARWIG *et alii* (1979) usaram coluna empacotada com 5% OV-101 sobre Chromosorb WHP nas mesmas condições cromatográficas descritas por HARVAN & PERO (1974), com detector de massas.

A cromatografia gasosa permitiu a separação dos derivados trimetilsilano dos ácidos tenuazônico e isotenuazônico. SCOTT & KANHERE (1980) determinaram o TeA e os dois isômeros do ácido isotenuazônico, presentes em extrato de tomate, por

cromatografia gasosa. As condições cromatográficas foram as usadas por HARVAN & PERO (1974), variando a programação de temperatura do forno, que foi de 140 a 250°C e o detector de massas.

#### 2.2.4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência

O TeA foi isolado e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por absorvância no ultravioleta (Tabela 2). SCOTT & KANHERE (1980) após terem testado diferentes combinações de coluna/fase móvel, encontraram 3 sistemas úteis para análise de TeA. A coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>) foi usada com 2 fases móveis diferentes: a) metanol/água (60:40, v/v) ou b) acetonitrilo/água (50:50, v/v), cada uma contendo 1% de acetato de amônio, 0,025% de 4-dodecildietilenotriamina e 0,001 M de sulfato de zinco nas soluções finais. A terceira combinação foi com coluna de troca de ânions e a fase móvel preparada pela adição de 2,5% de acetonitrilo à solução aquosa, contendo 0,05 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,1 M KCl. Os 2 sistemas com coluna de fase reversa permitiram a separação do TeA das substâncias interferentes nos extratos de produtos de tomate. A quantificação do TeA total, no ultravioleta a 280 nm, foi melhor com a fase móvel metanol/água, pois não houve separação parcial do ácido isotenuazônico. O sistema de troca de anions foi útil na confirmação do TeA. Entretanto não foi recomendado para a quantificação porque a curva padrão não apresentava resposta linear entre a quantidade de padrão injetada e a altura do pico no cromatograma para alguns dos pontos. O limite de detecção do método foi de 0,1 µg/g.

O sistema de CLAE desenvolvido por HEISLER *et alii* (1980) usava coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>), fase móvel metanol/água (90:10, v/v) e detector de absorvância no ultravioleta a 278 nm para a determinação de TeA em frutas e vegetais. Condições cromatográficas similares foram empregadas na determinação de TeA em amostras de maçã, mirtilo, tomate, laranja e limão (STINSON *et alii*, 1980; 1981).

Para análise de TeA em produtos de tomate, STACK *et alii* (1985) utilizaram coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>), fase móvel metanol/água (85:15, v/v) contendo 300 mg de ZnSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O/L e detectores ultravioleta (280 nm) e fluorescência ligados em série. Os limites de detecção encontrados foram de 25 ng/g em produtos de tomate fortificados e de 0,4 µg/g para amostras de tomates naturalmente contaminadas. Os valores de recuperação foram de 74 e 92% para amostras de ketchup fortificadas com 50 e 1000 ng/g, respectivamente. Resultados similares foram obtidos com amostras de extrato de tomate fortificadas.

VISCONTI *et alii* (1986) determinaram TeA em azeitonas e seus produtos (óleo e casca) utilizando as seguintes condições cromatográficas: detector de comprimento de onda variável a 280 nm, coluna de fase reversa e coluna de guarda. A fase móvel usada foi uma mistura de metanol/água (80:20, v/v) contendo 300 mg ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/L. Além do tempo de retenção, a identificação também foi realizada pela técnica de parar o fluxo e determinar o espectro no ultravioleta na faixa de 200 a 400 nm. As mesmas condições cromatográficas foram utilizadas por LOGRIECO *et alii* (1988) para determinar TeA em amostras de azeitona, semente de girassol, tomate, tangerina, pimentão e melão. A etapa de extração foi adaptada para cada amostra, considerando as diferentes características de cada uma.

Diferentes técnicas cromatográficas têm sido aplicadas na análise de TeA em alimentos e rações contaminados. LEBRUN *et alii* (1989) comparam três técnicas cromatográficas para a determinação de TeA: a) cromatografia de par iônico; b) cromatografia de troca aniônica; c) cromatografia por troca de ligante. A cromatografia de par iônico apresentou melhores resultados com o reagente citrimida e tampão fosfato, tendo como fase móvel uma mistura de metanol/água. A cromatografia de troca aniônica foi a que apresentou maior fator de seletividade mas, com o tempo a eficiência da coluna tende a diminuir devido a presença de sais metálicos na amostra. A adição de reagente complexante de metal à fase móvel previne a deterioração da coluna. A cromatografia por troca de ligante não se mostrou

seletiva para separar TeA e seus isômeros. A cromatografia de troca aniônica foi escolhida para determinar TeA em filtrado de *Pyricularia oryzae* devido a rapidez, simplicidade e seletividade.

Tabela 2 . Determinação de ácido tenuazônico por cromatografia líquida de alta eficiência.

Produto	Coluna	Fase móvel	Detector	Referência
arroz/frutas/ vegetais (tomate)	FR C <sub>18</sub>	Metanol/água (9:1)	U.V.(278 nm)	HEISLER <i>et alii</i> (1980)
extrato de tomate	FR C <sub>18</sub>	Metanol/água (60:40) com 1% acetato de amônio, 0,025% 4-dodecildietileno triamina e 0,001M ZnSO <sub>4</sub>	U.V.(280 nm)	SCOTT & KANHERE (1980)
maçã/tomate/ mirtilo/laranja/ limão	FR C <sub>18</sub>	Metanol/água (9:1)	U.V.(278 nm)	STINSON <i>et alii</i> (1980, 1981)
tomate e seus produtos	FR C <sub>18</sub>	Metanol/água (85:15) 300mg ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/L	U.V.(280 nm)	STACK <i>et alii</i> (1985)
azeitona	FR C <sub>18</sub>	Metanol/água (80:20) 300mg ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/L	U.V.(280 nm)	VISCONTI <i>et alii</i> (1986)
azeitona/semente de girassol/ tomate/tangerina/ pimentão/melão	FR C <sub>18</sub>	Metanol/água (80:20) 300mg ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/L	U.V.(280 nm)	LOGRIECO <i>et alii</i> (1988)

FR= fase reversa



## 2.3. Alternariol e alternariol monometil éter

### 2.3.1. Considerações gerais

Alternariol (AOH) e alternariol monometil éter (AME) são classificados como dibenzopirenos (Figuras 3 e 4). Os espectros no ultravioleta apresentam  $\lambda_{\max}$  para AOH em etanol são 213(  $\epsilon$  21900), 258(41700), 290(10500), 303 (11200) e 336 nm (11000); para o AME são 217 ( $\epsilon$  21900), 259 (47900), 297 (10500), 303 (10500), 336 nm (11000) (COOMBE *et alii*, 1968). Espectros no ultravioleta do AOH e AME são muito semelhantes, principalmente na região de 340 nm (SEITZ & MOHR, 1976).

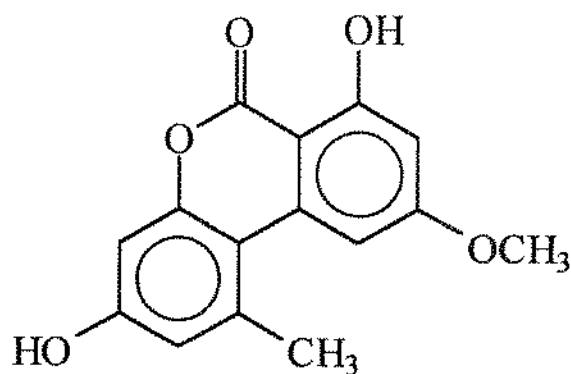


Figura 3. Estrutura química do alternariol monometil éter.

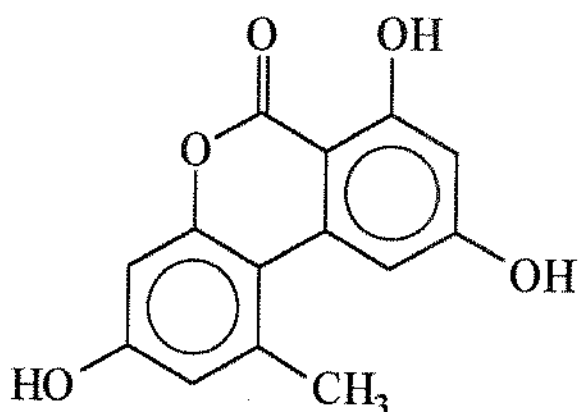


Figura 4. Estrutura química do alternariol.

### 2.3.2. Incidência e microorganismos produtores

Alternariol e alternariol monometil éter são metabólitos secundários produzidos em grandes quantidades pela maioria das espécies de *Alternaria*. ROSETT *et alii* (1957) encontraram estes dois compostos correspondendo a 13% do peso seco do micélio de uma cepa de *Alternaria tenuis*. Mas outros estudos determinaram que a concentração de AME+AOH chegava a atingir 20% do extrato cru de isolados de *Alternaria* (COMBE *et alii*, 1970; PERO *et alii*, 1973a; 1973b).

A ocorrência natural de AOH e AME foi relatada em diferentes tipos de vegetais. STARRAT & WHITE (1968) identificaram AME e AOH em micélios de *A. cucumerina* retirados de folhas de cantalupo e melância. Um estudo feito com grãos de sorgo de 7 diferentes regiões do Kansas (EUA) apontou a ocorrência de AME e AOH, sendo que a quantidade encontrada dependia principalmente da região e em menor extensão do cultivar. Foi observada uma correlação entre os níveis de AME e AOH com o grau de descoloração dos grãos e o número de dias de chuva nos meses de setembro e outubro. A razão entre as quantidades de AME e AOH nas amostras de sorgo foi variável, mas geralmente AOH foi o mais abundante (SEITZ *et alii*, 1975a). Além dos vegetais citados, AME e AOH foram extraídos de noz-pecã (SCHROEDER

& COLE, 1977). Cepas de *Alternaria* isoladas de tomate, maçã, laranja, limão (STINSON *et alii*, 1981; ROBIGLIO & LOPEZ, 1995) e semente de colza (VIÑAS *et alii*, 1993) produziram AME e AOH em meios de cultura.

BURROUGHS *et alii* (1976), utilizando isolados de *A. alternata*, testaram vários substratos para a produção de micotoxinas. Foi observado que não havia especificidade entre o tipo de substrato e o metabólito produzido, isto é, os substratos que permitiram uma maior produção de AME e AOH, também permitiram maior produção de outros metabólitos de *Alternaria*. Entretanto, em um estudo realizado com várias espécies de *Alternaria* (*A. alternata*, *A. tenui*, *A. hemicota* e *Alternaria* sp.) foi constatado que todos os isolados produziram AME e AOH, mas a quantidade variou consideravelmente com os isolados e os meios de cultura testados (MAAS *et alii*, 1981).

MAGAN *et alii* (1984) relataram que a atividade de água e a temperatura afetaram a produção de AME e AOH por *A. alternata*, sendo que a maior produção ocorreu a 0,98<sub>aw</sub> e 25°C. A produção de AME foi inibida a 30°C e em atividade de água inferior a 0,95. Para o mesmo tipo de fungo, diferentes meios de cultura, sintético, semi-sintético e natural (arroz), foram testados quanto a produção de AME e AOH. Houve maior produção de toxinas no meio semi-sintético e foi observada alteração do pH dos meios. No meio sintético o pH diminuiu de 4,0 para 2,1 e no meio semi-sintético aumentou de 5,1 para 6,8 (WEI & SWARTZ, 1985).

Além do tipo de substrato, outros parâmetros foram avaliados. Foi observado que a luz azul inibiu a produção de AME e AOH de 77% e 69%, respectivamente, sendo que a luz vermelha não causou nenhuma redução nos níveis das toxinas (HAGGBLOM & UNESTAM, 1979). A produção de AME e AOH ocorreu na fase estacionária da curva de crescimento e a presença de compostos nitrogenados, tal como NaNO<sub>3</sub> regulou a biosíntese de AME e AOH (MAGAN *et alii*, 1984).

ÖZEELICK & ÖZEELICK (1990) estudaram o efeito de tempo, temperatura, pH e tipo de açúcar sobre o crescimento de *A. hemicota*, *A. tenuis* e *A. solani*. A maior

quantidade de biomassa foi produzida a 25°C, entretanto a produção de metabólito tóxico foi favorecida à temperatura de 15°C. As espécies testadas cresceram melhor em pH 8,0, mas produção de micotoxina foi observada a pH 5,0 e apenas para *A. tenuis*. Pelos resultados obtidos concluíram que a maior produção de biomassa não implicou em maior produção de toxina e foi sugerido que muitas frutas "in natura" ou processadas e produtos de frutas poderiam representar substratos adequados para a produção de AME e AOH.

### 2.3.3. Efeitos tóxicos

AOH e AME são considerados toxinas com efeitos agudos fracos (o valor de DL50 para camundongos, via intraperitoneal, é maior que 400 mg/kg p.c.) (PERO *et alii*, 1973b). Entretanto, AME causou necrose visceral e os dois compostos apresentaram efeitos tóxicos para os fetos. Foi constatada redução de peso fetal e aumento significativo dos casos de reabsorção fetal em cricetos tratados, via intraperitoneal com 200 mg AME/kg p.c., sendo que com doses de 50 e 100 mg AME/kg p.c., nenhum efeito foi observado (POLLOCK *et alii*, 1982). Graves necroses viscerais foram encontradas nestes animais. Entretanto, não ficou esclarecido se estes compostos produziram tais lesões por administração oral na mesma dosagem. A administração oral de doses menores não teve efeito patológico observável em ratos (SAUER *et alii*, 1978; POLLOCK *et alii*, 1982).

PERO *et alii* (1973b) demonstraram que o AME era citotóxico e que a mistura de AOH/AME (1:1) apresentou efeito sinergista. Na dose de 100 mg/kg de peso corpóreo, o AOH teve efeito tóxico fetal em camundongos. Mas, para o AME na mesma dosagem não foram observados efeitos tóxico fetal ou teratogênico. Dose de 400 mg AME/kg.p.c. causou apenas 10% de mortalidade, sendo que a mesma dose de AOH resultou em 30% de mortalidade.

O AME é particularmente importante, porque estudos demonstraram ser carcinogênico (McCANN *et alii*, 1975) e mutagênico fraco pelo teste de AMES para

*Salmonella typhimurium* cepa TA 98. Porém o AOH não foi considerado mutagênico pelos critérios adotados (SCOTT & STOLTZ, 1980; DAVIS & STACK, 1994)). AN *et alii* (1989) reportaram que o AME foi um mutagênico forte para *Escherichia coli* ND 160. A diferença observada entre os resultados dos testes de mutagenicidade, sugere que a ação mutagênica do AME exibe alguma seletividade em relação a regiões específicas ou sequência do DNA. Foi relatada uma possível correlação entre a contaminação de grãos por *Alternaria alternata*, com a elevada incidência de câncer esofágico em algumas áreas da China.

A fitopatogenicidade do AME foi observada por PERO & MAIN (1970), ao induzirem a clorose em folhas da planta de tabaco intactas, pela injeção de AME extraído de culturas de *Alternaria tenuis*. Porém, não foi detectado em folhas de tabaco naturalmente contaminadas. Não ficou demonstrado se houve inibição da produção de clorofila ou destruição da clorofila existente. SOBERS & DOUPNIK (1972), testando 137 isolados de *Alternaria longipes*, sugeriram a existência de uma relação entre patogenicidade para folhas de tabaco e frangos de um dia de vida. Dos 58 isolados patogênicos para tabaco, 43 (74,3%) tiveram efeito significativo no teste com aves e dos 79 isolados não patogênicos, 59 (74,7%) não foram tóxicos, 7 foram tóxicos e 13 foram letais.

A podridão preta do tomate causada por *Alternaria alternata* frequentemente provoca perdas substanciais na indústria de produtos de tomates na Califórnia. A formação de orvalho na superfície do fruto é o fator mais importante para o desenvolvimento da podridão preta na ausência de chuvas. A baixa temperatura (5 a 10°C) também pode predispor o fruto à infecção por *A. alternata* (PEARSON & HALL, 1975).

### 2.3.4. Metodologia analítica

#### 2.3.4.1. Extração e limpeza

Na determinação de AME e AOH por métodos cromatográficos, as amostras de tabaco, grão de sorgo, noz-pecã, maçã, tomate e meios de cultura foram submetidos a etapa de extração com solventes orgânicos, tais como acetona (LUCAS *et alii*, 1971; SCHROEDER & COLE, 1977), metanol (SEITZ & MOHR, 1976), hexano (HARWIG *et alii*, 1979), acetato de etila (SÖDERHALL *et alii*, 1978; SCOTT & STOLZ, 1980) e clorofórmio (STINSON *et alii*, 1980).

MAAS *et alii* (1981), após a extração de AME e AOH com metanol, promoveram a partição com diclorometano. Uma variação deste método consistiu em alcalinizar o extrato metanólico com sulfato de amônia seguido por partição com hexano. A camada de hexano foi descartada e a camada inferior submetida à partição com diclorometano (MAGAN *et alii*, 1984).

#### 2.3.4.2. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada foi utilizada na determinação de AME e AOH em vários tipos de amostras. A fase móvel tetrahidrofurano/benzeno (80:20, v/v) e a fase estacionária de sílica gel foram usadas por LUCAS *et alii* (1971) para analisar AME e AOH em amostras de tabaco. SEITZ *et alii* (1975b) testaram 6 tipos de fases móveis na separação de AME e de zearalenona (ZEA) em amostras de grão de sorgo contaminadas com *Alternaria sp.* Mas apenas um sistema de fase móvel (benzeno/etanol, 96:4, v/v) mostrou-se efetivo na separação das 2 micotoxinas.

Os dibenzopirenos, AME e AOH foram detectados em placas de sílica gel, pelo uso de luz ultra-violeta (PERO *et alii*, 1971; 1973a; SEITZ *et alii*, 1975b), pela exposição a vapores de iodo seguida por borrifação com ácido sulfanílico (PERO *et alii*, 1971) e pelo uso de spray de ácido sulfúrico-etanol 50%, seguido por aquecimento a 100° C por 5 minutos (SCHROEDER & COLE, 1977).

DURACKOVÁ *et alii* (1976) desenvolveram um método de análise sistemática, por CCD para 37 micotoxinas, incluindo AME e AOH. Foram determinados os valores de R<sub>f</sub> para as micotoxinas em oito sistemas de solventes com diferentes polaridades a saber, benzeno/metanol/ácido acético glacial (24:2:1, v/v/v), tolueno/acetato de etila/ácido fórmico 90% (6:3:1, v/v/v), benzeno/etanol (95:5, v/v), clorofórmio/metanol (4:1, v/v), clorofórmio/metilisobutilcetona (4:1, v/v), clorofórmio/acetona (9:1, v/v), clorofórmio/ácido acético glacial/dietil éter (17:1:3, v/v/v) e n-butanol/ácido acético glacial/água (4:1:4, v/v/v). A detecção foi feita por luz ultravioleta e pelas reações características de cor com p-anisaldeído e cloreto férrico.

O AME e AOH foram determinados quantitativamente por CCD, utilizando-se densitômetro (SODERHALL *et alii*, 1978) ou espectrofotômetro adaptado para leitura da fluorescência dos compostos em placa de sílica, equipado com lâmpada de mercúrio (HÄGGBLÖM & UNESTAM, 1979).

#### 2.3.4.3. Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (CG) foi usada com algum sucesso para separar quantitativamente AOH e AME após derivatização utilizando detector por ionização em chama e derivação. LUCAS *et alii* (1971) analisaram por CG amostras de tabaco usando coluna com 3% OV-17 sobre Gas Chrom Q, temperatura programada de 200 a 250°C numa razão de 2 °C/min. O limite de detecção foi de 0,1 µg para cada micotoxina, sendo que na amostra foi de 0,635-0,25 µg/g de amostra.

PERO *et alii* (1971b) testaram colunas de vidro empacotadas com as seguintes fases líquidas, OV-1, OV-17 e OV-25 nas seguintes concentrações, 1, 3 e 10% sobre Gas Chrom Q. As temperaturas do injetor e detector foram de 350°C. Os derivados trimetilsilano dos dibenzopirenos foram separados satisfatoriamente e o limite de detecção foi de 0,1 µg para AME e AOH. Além das fases citadas outras foram testadas, OV-11, OV-101 e Dexsil 300 sobre Gas Chrom Q. Resultados satisfatórios

não foram fornecidos pelas fases OV-25 e Dexsil-300 mas OV-11, OV-17 e OV-101 demonstraram melhor resolução dos picos. As temperaturas do injetor e detector foram de 300°C e a temperatura programada de 100 a 250°C numa razão de 8°/min (PERO & HARVAN, 1973).

#### 2.3.4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência

Os dibenzopirenos AME e AOH podem ser separados por métodos de CLAE (Tabela 3). As vantagens destes métodos sobre CG são que os derivados silano não são necessários, o tempo de análise é menor e é possível o uso simultâneo de detectores de fluorescência e ultravioleta. SEITZ & MOHR (1976) utilizaram, para a determinação de AOH e AME em amostras de sorgo, coluna de fase normal (sílica) e fase móvel com sistema de gradiente com um aumento da quantidade de tetrahydrofurano em éter de petróleo ou isooctano. As micotoxinas foram detectadas pela fluorescência e pela absorvância no ultravioleta. A quantificação de AME e AOH foi baseada na fluorescência, sendo o limite de detecção inferior a 100 µg/kg.

O sistema isocrático de CLAE utilizado por HEISLER *et alii* (1980), com coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>) e fase móvel acetona/água (65:35, v/v), forneceu boa separação entre os compostos em menos de 20 minutos usando detector de absorção no ultravioleta a 324 nm. MAAS *et alii* (1981) empregando a fase móvel água/metanol/tetrahydrofurano (30:65:5, v/v/v) e coluna de fase reversa, obtiveram separação adequada de AOH e AME em tempo inferior ao citado anteriormente. Os limites de detecção, com o detector de comprimento de onda variável a 350 nm foram de 20 e 40 ng para AME e AOH, respectivamente.

CHU & BENNETT (1981) também utilizaram coluna de fase reversa para analisar estas toxinas quantitativamente, mas foi usado sistema de eluição com gradiente (aumento linear de metanol em ácido acético 1,5%). Em produtos comerciais derivados de vegetais e frutas, WITTKOWSKI *et alii* (1983) determinaram AME e AOH utilizando coluna de fase reversa C<sub>18</sub>, fase móvel água/acetoneitrilo (1:1,



v/v) e detector espectrofotométrico a 340 e 276 nm. A reprodutibilidade obtida para AME e AOH foi de 82 e 73%, respectivamente.

Na separação e quantificação de AOH e AME em amostras de azeitona e seus derivados (produtos) foi empregada coluna analítica e coluna de guarda com fase estacionária de octadecilsilano e fase móvel metanol/água (80:20, v/v) contendo 300 mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O/L$ . Os limites de detecção foram de 30  $\mu g$  AME/kg e 50  $\mu g$  AOH/kg com detector de comprimento de onda variável a 257 nm (VISCONTI *et alii*, 1986). Amostras de trigo, cevada e aveia foram analisadas com o mesmo tipo de coluna mas utilizando detector de fluorescência e fase móvel acetonitrilo/ácido fosfórico 7 mM/tetrahidrofurano/ácido acético glacial (32:57:11:2, v/v/v/v) (GRUBER-SCHLEY & THALMANN, 1988).

Além da utilização dos detectores de ultravioleta e/ou fluorescência, foi demonstrado por PALMISANO *et alii* (1989a) o potencial do detector espectrofotométrico ultravioleta/visível com arranjo de diodos. AOH e AME foram, simultaneamente, separados e determinados em uma variedade de matrizes, utilizando CLAE com coluna analítica e coluna de guarda de octadecilsilano. A recuperação obtida variou de 50 a 72% para AOH e de 70 a 73% para AME.

O uso de sistemas eletroquímicos de detecção foi proposto para a determinação de metabólitos de *Alternaria* (inclusive AME e AOH) em matrizes complexas tais como, meios de cultura de fungos ou gêneros alimentícios contaminados. MAGAN *et alii* (1984) utilizaram detectores de fluorescência e eletroquímico para analisar grãos de trigo e meios de cultura, com coluna de fase reversa e fase móvel metanol/acetato de amônio 0,2 M (70:30). Detector eletroquímico também foi utilizado pra análise de AME e AOH em meios de cultura e rações. Neste caso empregou-se coluna de fase reversa e fase móvel com sistema de gradiente com aumento da quantidade de metanol em solução de tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0) (PALMISANO *et alii*, 1989b).

Tabela 3 . Determinação de alternariol e alternariol monometil éter por cromatografia líquida de alta eficiência.

Produto	Coluna	Fase móvel	Detector	Referência
sorgo	FN sílica	Éter de petróleo/ THF gradiente	Fluorescência e U.V. (350nm)	SEITZ & MOHR 1976
arroz/frutas/vegetais (tomate)	FR C <sub>18</sub>	Acetona/água (65:35)	U.V. (324nm)	HEISLER <i>et alii</i> (1980)
meio de cultura	FR C <sub>18</sub>	Água/metanol/ THF(30:65:5)	U.V. (350nm)	MAAS <i>et alii</i> (1981)
meio de cultura	FR C <sub>18</sub>	Metanol/ácido acético 15% (gradiente)	U.V.(254 nm)	CHU & BENNET (1981)
produtos de frutas e vegetais	FR C <sub>18</sub>	Água/acetonitrilo (1:1)	U.V. (340 e 276 nm)	WITTKOWSKI <i>et alii</i> (1983)
grão de trigo/ meio de cultura	FR C <sub>18</sub>	Metanol/acetato de amônio (0,2mM) (70:30)	Fluorescência ( $\lambda$ excitação 315 nm e $\lambda$ emissão 430 nm) e Eletroquímico	MAGAN <i>et alii</i> (1984)
azeitona derivados	FR C <sub>18</sub>	Metanol/água (80:20) 300mg ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O/L	U.V.(257 nm)	VISCONTI <i>et alii</i> (1986)
trigo/cevada/aveia	FR C <sub>18</sub>	Acetonitrilo/ ácido fosfórico 7mM/ THF/ácido acético glacial (32:57:11:2)	Fluorescência ( $\lambda$ excitação 340 nm e $\lambda$ emissão 430 nm)	GRUBER-SCHLEY & THALMANN (1988)
arroz/milho/tomate rações	FR C <sub>18</sub>	Metanol/água acidificada com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (gradiente)	Arranjo de diodos	PALMISANO <i>et alii</i> (1989a)
meio de cultura/ rações	FR C <sub>18</sub>	Metanol/tampão fosfato (gradiente)	Eletroquímico	PALMISANO <i>et alii</i> (1989b)

FN= fase normal, FR= fase reversa, U.V.= Ultravioleta

THF= tetrahydrofurano

### **3.0 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Reagentes, Solventes e Materiais diversos**

- Padrões: alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico sob a forma de sal cúprico, marca Sigma
- Celite comercial
- Filtros para fase móvel orgânica, marca Millipore
- Filtros para amostra orgânica FHLP 01300, 0,5 $\mu$ m, marca Millipore
- Solução de sulfato de amônia 10%(m/v)
- Reagentes de uso comum em laboratório, grau para análise
- Reagentes grau Lichrosolv (para cromatografia)

#### **3.2. Equipamento**

- Espectrofotômetro ultravioleta/visível, modelo Lambda 6, marca Perkin Elmer
- Banho-maria, modelo 100, marca Fanem
- Centrífuga, modelo Excelsa II, marca Fanem
- Colunas cromatográficas com fase estacionária de octadecilsilano: Spherisorb ODS-1, 5  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm, marca Alltech e Spherisorb ODS-2, 5  $\mu$ m, 250 x 4,6mm, marca Sigma Aldrich
- Coluna de guarda com fase estacionária de octadecilsilano, Resolve<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>, marca Waters
- Pré-coluna com recheio de sílica, 3 cm, SI-10, MPLC Holder, marca Varian
- Cromatógrafo à líquido, modelo 1050, com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos modelo 1050, acoplado a computador com software PHOENIX, macro SPECTRA, marca Hewlett Packard

- Liquidificador comercial, copo de aço inox 1L, marca Waring
- Evaporador Rotatório com termostato, modelo TE 120, marca Tecnal
- Seringa para filtração de amostras, marca Multfit
- Lâmpada UV de alta intensidade, modelo UVGL 58, multibanda 254/366 nm, Light
- Micropipetadores digital com volumes reguláveis 100-1000  $\mu\text{L}$  e 10-100  $\mu\text{L}$ , modelo Justor 1100 DG, marca Nichiryo
- Microseringa de 100  $\mu\text{L}$ , marca Hamilton
- Banho ultra-som, SX-20 ,marca Microsonic
- Ultra purificador de água para uso em CLAE, marca Milli Q

### 3.3. Amostras

Para o desenvolvimento do método analítico e avaliação da incidência das micotoxinas foram utilizadas amostras de produtos de tomate adquiridas em estabelecimentos comerciais.

A aquisição de amostras foi realizada ao acaso em alguns pontos do comércio varejista da região de Campinas (S.P.) no período de dezembro de 1994 a dezembro de 1995. Por tratar-se de alimentos líquidos ou pastosos, foram tomadas amostras de no mínimo 500g ou 500mL, já que o tipo de processamento fornece produtos mais homogêneos. Foram usados os seguintes produtos: suco de tomate, polpa de tomate, purê de tomate, extrato simples concentrado de tomate e tomates pelados

Todas as amostras (Tabela 4 ) foram armazenadas à temperatura ambiente até o momento de análise, sendo observado o prazo de validade dos produtos.

Tabela 4 - Amostras de produtos de tomate adquiridas na cidade de Campinas, utilizadas para avaliar a incidência de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico.

Produto	Marca	Número de amostras	Especificação de ingredientes na embalagem
Suco de tomate	A	6	suco de tomate e sal
	B	3	tomate, xarope de glicose e sal refinado
	C	2	suco de tomate e sal
Polpa de tomate	B	4	tomates
	C	3	tomate, açúcar e sal
	D	3	tomate e sal
	G	7	polpa de tomate e sal
	J	3	tomate e sal
	L	2	tomate e sal
Purê de tomate	B	2	polpa de tomate e sal
	C	4	tomate, açúcar e sal
	D	1	polpa de tomate e sal
	G	6	tomate
	I	3	polpa de tomate, sal e açúcar
	K	6	tomate
Extrato de tomate	B	2	tomates e sal
	C	2	tomate, açúcar e sal
	D	3	tomate e sal
	E	3	tomate e sal
	F	2	tomate e sal
	G	1	polpa concentrada de tomate e sal
	H	1	tomate, sal e açúcar
	I	5	tomate, sal e açúcar
	J	2	tomate e sal
K	3	tomate e sal	
Tomates pelados	G	1	tomates pelados inteiros e purê de tomates-ET XLIV
<b>TOTAL</b>	<b>11</b>	<b>80</b>	

ET.XLIV=estabilizante

### **3.4. Padrões**

#### **3.4.1. Preparo das soluções estoque**

As soluções estoques foram preparadas pesando-se os padrões em balança analítica com 6 casas decimais e dissolvendo-os em metanol, grau para cromatografia líquida. As concentrações das soluções foram determinadas pela razão entre o peso de padrão e o volume de solvente usado. As concentrações das soluções estoques foram AME 0,133  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , AOH 0,500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , CpA 0,537  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e TeA 0,370  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

#### **3.4.2. Preparo das soluções de trabalho**

As soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções estoque, retirando-se alíquotas e fazendo as diluições adequadas usando metanol, grau para cromatografia líquida. As concentrações das soluções de trabalho foram AME 6,3  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , AOH 15,0  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , CPA 10,7  $\text{ng}/\mu\text{L}$  e TEA 7,4  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Todas as soluções padrões foram armazenadas em frascos âmbar vedados, sob temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Durante o trabalho, a estabilidade dos padrões foi monitorada periodicamente, porque os padrões de CpA e TeA podem originar isômeros quando em solução. A formação de isômero foi detectada por CLAE, nas condições de trabalho. Quando necessário novas soluções estoque de padrões eram preparadas.

### **3.5. Contaminação artificial das amostras de produtos de tomate**

As amostras foram artificialmente contaminadas pela adição de quantidades definidas de cada padrão, citado em 3.4.2, com um pipetador automático e homogeneização em liquidificador, para garantir uma perfeita distribuição da toxina na amostra.

### 3.6. Testes de derivação química

As micotoxinas (AOH, AME, CpA e TeA) foram testadas com reagentes de derivação objetivando a obtenção de derivado que permitisse a confirmação destas micotoxinas em CLAE.

#### 3.6.1. Derivação com cloreto de dansila

O método de dansilação testado foi o relatado por LAWRENCE & FREI (1976). Neste método, ocorre a dansilação direta de hidroxibifenóis, bifenis ou clorofenóis. Foram adicionados 0,2 mL de cloreto de dansila 0,1% em acetona e 30  $\mu$ L de carbonato de sódio 0,1 M sobre quantidade adequada de cada padrão a ser tratado. A mistura foi mantida a 45°C por 20 minutos. Em seguida adicionam-se duas gotas de hidróxido de sódio 1M. Os produtos da reação extraídos em hexano foram analisados em CLAE utilizando como fase estacionária coluna de sílica (5  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm, marca Altech). A mistura hexano/isopropanol foi utilizada nas seguintes proporções 95:5, 90:10 e 85:15 (v/v) como fase móvel, com vazão de 1 mL/min. O comprimento de onda de leitura foi de 226 nm. Os produtos de reação foram também monitorados e observados em espectrofotômetro ultravioleta/visível numa faixa de comprimento de onda de 190 a 550 nm.

#### 3.6.2. Derivação com o 2,4 dinitrofenilhidrazina

O procedimento de derivação utilizado foi o proposto por HENRY *et alii* (1971), que consiste na reação de 0,1 mL de 2,4 dinitrofenilhidrazina 0,2% em metanol com cada composto a ser reagido dissolvido em metanol acidificado por ácido clorídrico. Após a adição de reagentes seguiu-se aquecimento à temperatura de 50°C por 5 minutos. Os produtos foram monitorados em espectrofotômetro ultravioleta/visível numa faixa de comprimento de onda de 190 a 550 nm e por CLAE

com coluna de fase reversa Spherisorb ODS-2, fase móvel metanol/água (90:10, v/v) com 150 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$  a uma vazão de 0,8 mL/min e absorção a 254 nm.

### **3.6.3. Metilação usando o trifluoreto de boro como catalizador**

Esta reação de derivação consiste na metilação do composto utilizando o trifluoreto de boro ( $\text{BF}_3$ ) como catalisador. Foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  da solução metanólica de  $\text{BF}_3$  a 20% aos padrões de AME, AOH, CpA e TeA, separadamente, e mantidos à temperatura de 45°C por uma hora. Os produtos de reação foram monitorados em espectrofotômetro ultravioleta/visível numa faixa de 190 a 550 nm e analisados por CLAE em coluna de fase reversa  $\text{C}_{18}$ , utilizando-se como fase móvel metanol/água (90:10, v/v) com 150 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$  a uma vazão de 0,8 mL/min e absorção a 280 nm.

### **3.7. Estudo da estabilidade dos padrões de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico frente a temperatura**

Soluções metanólicas dos padrões com concentrações definidas foram mantidas sob aquecimento a 90°C por 30 minutos. Estas soluções foram analisadas antes e depois do tratamento térmico por CLAE com coluna de fase reversa Spherisorb ODS-2 e fase móvel metanol/água (80:20, v/v) para AME e AOH, e metano/água (90:10, v/v) para CpA e TeA, com 300 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$  em ambas as fases móveis. Para AOH e AME a detecção foi a 250 nm, sendo que para CpA e TeA foi a 280 nm.



### **3.8. Determinação das condições de trabalho no cromatógrafo a líquido para os padrões de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico.**

A seleção de fases móveis e tipos de colunas cromatográficas foi realizada considerando-se dados da literatura e as características de cada composto. Os comprimentos de onda para se fazer as determinações das absorvâncias foram escolhidos considerando-se os  $\lambda_{\max}$  de cada composto. Para a determinação de AOH e AME foi escolhido o  $\lambda_{\max}$  250 nm, devido ao maior valor da absorvidade molar. O comprimento de onda de 280 nm foi escolhido para determinar TeA e CpA, apesar de não apresentar a maior absorvidade molar para CpA. SCOTT & KANHERE (1986) relataram que no  $\lambda_{\max}$  280 nm a sensibilidade era maior e mais adequado para análise de TeA em produto de tomate.

Inicialmente, foram testados apenas os padrões de micotoxinas previamente dissolvidos em metanol. Foram realizadas injeções de cada micotoxina, tanto isolada como associada as outras, procurando o melhor sistema de fase móvel (Tabela 5) no cromatógrafo à líquido, sob as mesmas condições cromatográficas, a seguir especificadas:

Fase Estacionária: Coluna fase reversa Spherisorb ODS-1 5 $\mu$ m, 15cm;

Coluna fase reversa Spherisorb ODS-2 5 $\mu$ m, 25cm

Comprimento de onda de leitura do detector: 250 nm e 280 nm

Tempo de corrida cromatográfica: 15 minutos e 25 minutos

Tabela 5 -Sistemas de fases móveis testados para a determinação de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico em produtos de tomate.

Solventes	Proporção (v/v)	Concentração de ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O(mg/L)	Vazão (mL/min)
metanol	100	0	1,0
metanol	100	300	1,0
metanol	100	150	1,0
metanol/água	90:10	0	1,0
metanol/água	90:10	150	1,0
metanol/água	90:10	300	1,0
metanol/água	90:10	300	0,9
metanol/água	90:10	300	0,8
metanol/água	80:20	0	1,0
metanol/água	80:20	150	1,0
metanol/água	80:20	300	1,0
metanol/água	80:20	300	0,9
metanol/água	80:20	300	0,8
metanol/água	80:20	300	0,7
metanol/água	70:30	300	0,8
metanol/água	50:50	300	0,7

### **3.9. Desenvolvimento da metodologia analítica**

#### **3.9.1. Procedimentos propostos para extração e limpeza dos produtos de tomate na determinação de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico.**

O objetivo inicial visava obter um procedimento único de extração e limpeza para produtos de tomate que permitisse a determinação das quatro toxinas (AME, AOH, CpA e TeA) simultaneamente. Foram propostos e executados treze procedimentos visando encontrar um método que atendesse ao desejado. A seguir, são apresentados de forma esquematizada e simplificada os treze procedimentos testados:

### Procedimento 1

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 75 mL de metanol por 2 minutos



Filtrar



Recolher 40 mL do filtrado



Clarificar pela adição de 80 mL de sulfato de amônia 5%



Filtrar



Partição com 10 mL de diclorometano



Separar adequadamente a fase orgânica da fase aquosa



Fase orgânica



Evaporar até secura



Dissolver o resíduo em  
1 mL de metanol



Fase aquosa



Acidificar até pH 2 com HCl 6M



Partição com 50 ml de diclorometano  
(2vezes)



Combinar os extratos



Extrair com 30 mL de bicarbonato de sódio  
5%



Coletar o extrato aquoso. Recuperar para a  
forma ácida ajustando o pH para 2 (HCl 6M)



Extrair com 30 mL de diclorometano  
(2vezes)



Lavar o extrato com 30 mL de água



Evaporar até secura e dissolver em 2 ml de  
metanol

### Procedimento 2

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 200 mL de metanol



Centrifugar (2 minutos)



Filtrar



Dissolver o resíduo em 100 mL de metanol



Centrifugar (2 minutos)



Filtrar



Recolher 120 mL do filtrado e adicionar 80 mL de sulfato de amônia 5%



Centrifugar



Filtrar



Coletar 150 mL do filtrado e extrair 2 vezes com 10 mL de diclorometano



Separar as fases (idem procedimento 1)

### Procedimento 3

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 450 mL de água e 100 mL de clorofórmio



Centrifugar (10 minutos)



Coletar líquido sobrenadante



Separar as fases e coletar 50 mL da camada inferior



Aplicar o extrato em coluna de sílica e eluir com clorofórmio/metanol (9:1, v/v) e metanol contendo sulfato de zinco



Evaporar as frações e dissolver em 2 mL de metanol

#### Procedimento 4

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 150 mL de metanol por 2 minutos



Filtrar



Recolher 120 mL do filtrado e clarificar com 30 mL de sulfato de amônia 15%



Filtrar



Partição com clorofórmio (60 mL)



Evaporar o clorofórmio, dissolver o resíduo em 2 mL de metanol



Aplicar em coluna de sílica e eluir com clorofórmio e clorofórmio/metanol (9:1, v/v)



Coletar as frações, evaporar e dissolver em 2 mL de metanol

#### Procedimento 5

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 150 mL de metanol/água (70:30, v/v) por 2 minutos



Filtrar



Recolher 120 mL do filtrado e clarificar com 30 mL de sulfato de amônia 15%



Filtrar



Partição com clorofórmio (60 mL)



Evaporar e dissolver o resíduo em 2 mL de metanol



Aplicar em coluna de sílica e eluir com clorofórmio e clorofórmio/metanol (9:1, v/v)



Coletar as frações, evaporar e dissolver em 2 mL de metanol

### Procedimento 6

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 150 mL de metanol/água (70:30, v/v) por 2 minutos



Filtrar



Recolher 120 mL do filtrado



Clarificar com 30 mL de sulfato de amônia 15%



Filtrar



Partição com 20 mL de hexano. Descartar a camada de hexano



Partição com clorofórmio (60 mL)



Evaporar e dissolver o resíduo em 2 mL de metanol



Aplicar em coluna de sílica e eluir com clorofórmio e clorofórmio/metanol (9:1, v/v)



Coletar as frações, evaporar e dissolver em 2 mL de metanol

### Procedimento 7

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 150 mL de metanol + 15 mL de cloreto de potássio 4% por 2 minutos



Filtrar



Recolher 130 mL do filtrado e clarificar com sulfato de amônia 15%



Filtrar



Partição com clorofórmio (60 mL)



Evaporar, dissolver o resíduo em 2 mL de metanol



Aplicar em coluna de sílica e eluir com clorofórmio e clorofórmio/metanol (9:1, v/v)



Coletar as frações, evaporar e dissolver em 2 mL de metanol

### Procedimento 8

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 150 mL de metanol por 3 minutos



Filtrar



Recolher 120 mL do filtrado e clarificar com 30 mL de sulfato de amônia 15%



Filtrar



Acidificar o filtrado com HCl 6 M até pH 2



Partição com clorofórmio (60 mL)



Evaporar e dissolver o resíduo em 2 mL de metanol



Aplicar em coluna de sílica e eluir com clorofórmio e clorofórmio/metanol (9:1, v/v)



Coletar as frações, evaporar e dissolver em 2 mL de metanol

### Procedimento 9

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 150 mL de metanol por 3 minutos



Filtrar



Recolher 120 mL do filtrado e clarificar com 30 mL de sulfato de amônia 15%



Partição com 30 mL de hexano (descartar a camada de hexano)



Partição com clorofórmio (60 mL)



Evaporar e dissolver o resíduo em 5 mL de metanol



Aplicar em coluna de Florisil eluir com clorofórmio e clorofórmio/metanol (9:1, v/v)



Coletar as frações, evaporar e dissolver em 2 mL de metanol



### Procedimento 10

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 150 mL de metanol mais 10 cc de Celite por 2 minutos



Filtrar



Recolher 120 mL do filtrado e clarificar com 30 mL de sulfato de amônia 15% e celite



Filtrar



Partição com 30 mL de hexano (descartar a camada de hexano)



Partição com clorofórmio (60 mL)



Evaporar e dissolver o resíduo em 2 mL de metanol



Aplicar em coluna de sílica e eluir com clorofórmio e clorofórmio/metanol (9:1, v/v)



Coletar as frações e evaporar e dissolver em 2 mL de metanol

### Procedimento 11

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 150 mL de metanol por 2 minutos



Filtrar



Recolher 120 mL do filtrado



Clarificar com 30 mL de sulfato de amônia 10% e Celite



Filtrar



Partição com 30 mL de hexano (descartar a camada de hexano)



Partição com clorofórmio (60 mL)



Evaporar e dissolver o resíduo em 2 mL de metanol

### Procedimento 12

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 150 mL de metanol por 2 minutos



Filtrar



Recolher 120 mL do filtrado e clarificar com 60 mL de sulfato de amônia 10%



Filtrar



Partição com 30 mL de hexano (descartar a camada de hexano)

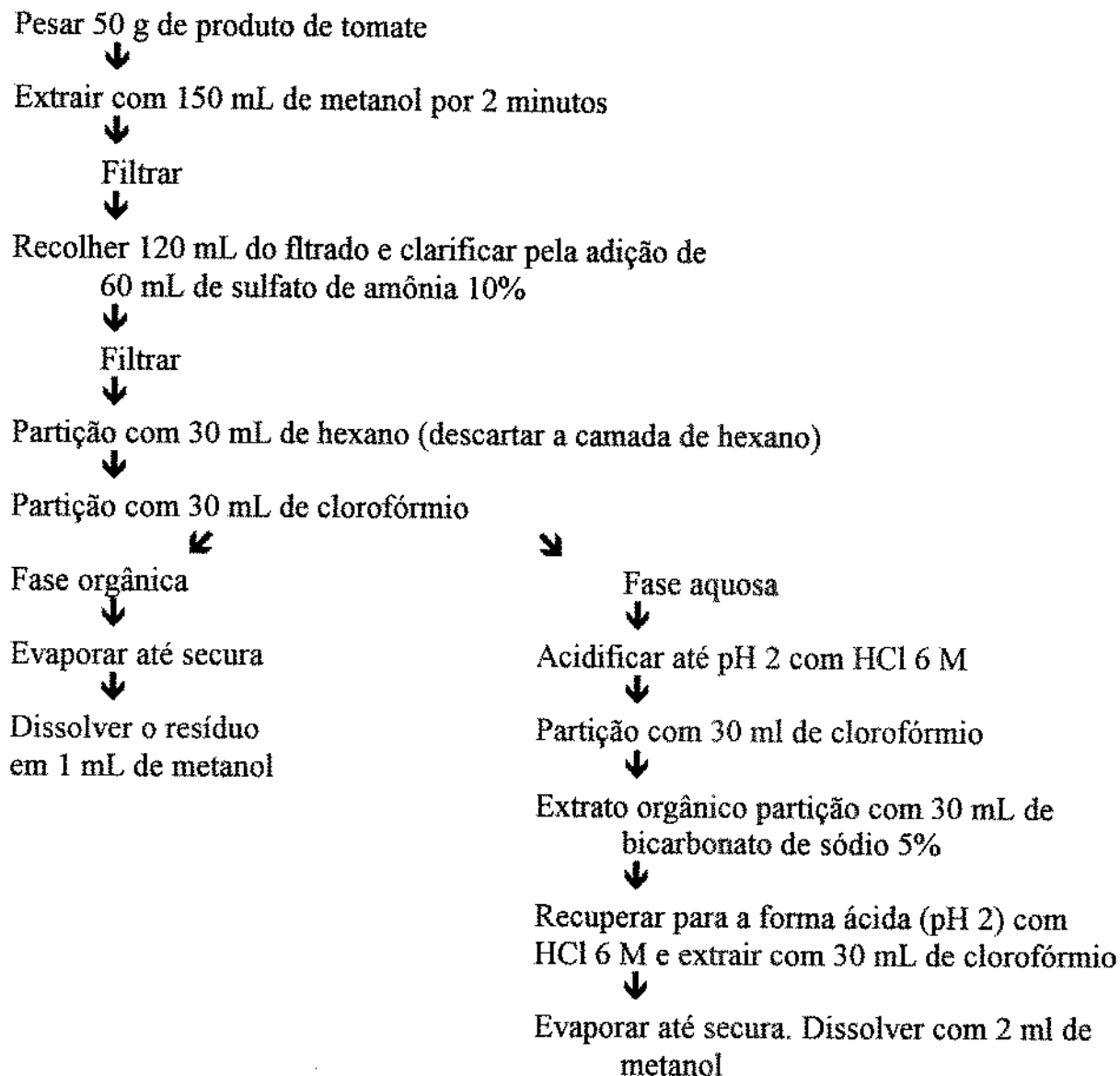


Partição com clorofórmio (60 mL)



Evaporar, dissolver o resíduo em 2 mL de metanol

### Procedimento 13



Os treze procedimentos descritos foram executados e a partir da análise dos resultados obtidos concluiu-se que não era viável um único procedimento para a determinação de AME, AOH, CpA e TeA. Os procedimentos 14 e 15 foram desenvolvidos a partir dos resultados dos procedimentos anteriores para a determinação de AME/AOH e CpA/TeA, respectivamente.

**Procedimento 14 (para AME e AOH)**

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 200 mL de metanol por 3 minutos



Filtrar



Recolher 200 mL do filtrado e clarificar com 60 mL de sulfato de amônia 10%



Filtrar



Partição com 80 mL de clorofórmio



Evaporar a 35 °C dissolver o resíduo em 2 mL de metanol

**Procedimento 15 (para CpA e TeA)**

Pesar 50 g de produto de tomate



Extrair com 200 mL de metanol por 3 minutos



Filtrar



Recolher 200 mL do filtrado



Partição com 40 mL de hexano (descartar a camada de hexano)



Acidificar com ácido clorídrico 6 M até pH 2



Partição com 80 mL de clorofórmio



Lavar a camada de clorofórmio com 30 mL de água



Evaporar a 35 °C e dissolver o resíduo em 2 mL de metanol

### **3.9.2. Otimização dos procedimentos 14 e 15**

#### **3.9.2.1. Relação entre a quantidade de amostra e o volume de solvente extrator**

Foram testadas as relações 3:1 (150 mL:50 g) e 4:1 (200 mL:50 g) para o volume de solvente extrator e a quantidade de amostra usados nos procedimentos 14 e 15. Uma variação destas proporções foi testada mantendo a relação 3:1 ou 4:1, mas separando parte do volume (50 mL) usado na extração para lavar as paredes do copo do liquidificador, melhorando a eficiência na transferência de material.

#### **3.9.2.2. Limpeza do extrato metanólico**

No procedimento 14 foi testada a adição de Celite na etapa de clarificação juntamente com o sulfato de amônia. Para o procedimento 15 foram testados os tempos de partição com hexano de 1, 2 e 3 minutos.

#### **3.9.2.3. Volume de clorofórmio usado na partição**

O volume de clorofórmio utilizado na partição nos procedimentos 14 e 15 foi de 80 mL com as seguintes variáveis: a) utilizar o volume total em uma única partição, b) dividir em partes iguais e fazer a partição em duas etapas.

#### **3.9.2.4. Tempo de partição**

Além do volume de clorofórmio foram testados os seguintes tempos de partição (agitação em funil de separação do extrato metanólico com o clorofórmio): 1, 2 e 3 minutos.

### **3.9.2.5. Limpeza do extrato clorofórmico**

A etapa de lavagem do extrato clorofórmico presente no procedimento 14 e 15 foi avaliada quanto aos efeitos da temperatura e da pureza da água usada. Para verificar o efeito da temperatura da água foram utilizadas: a) temperatura ambiente (25°C) e b) refrigerada (15-18°C). Quanto a pureza testou-se: a) água destilada e b) água purificada no Milli Q.

### **3.9.3. Adequação das condições de trabalho no cromatógrafo à líquido para os extratos de produto de tomate**

Os extratos obtidos nos procedimentos 14 e 15 foram cromatografados utilizando os sistemas de fases móveis listados na Tabela 4 (item 3.8). Para cada fase móvel citada na tabela foram realizadas injeções de padrões, extratos não contaminados e extratos contaminados, visando verificar a fase móvel mais adequada. As condições de operação do instrumento estão citadas no item 3.8.

### **3.9.4. Métodos propostos**

#### **3.9.4.1. Procedimento para determinação de alternariol e alternariol monometil éter**

##### **Extração e limpeza**

Pesar 50 g de produto de tomate. Extrair com 150 mL de metanol por 3 minutos, em liquidificador de copo de aço a baixa velocidade. Filtrar em papel qualitativo sanfonado, lavando as paredes do copo com 50 ml de metanol adicionais.

Passar uma alíquota de 200 mL do filtrado para um béquer de 500 mL e juntar 60 mL de sulfato de amônia 10%. Filtrar em papel de filtro qualitativo sanfonado.

Transferir uma alíquota de 200 mL do extrato clarificado para funil de separação de 500 mL com torneira de teflon. Realizar duas partições com 40 mL de clorofórmio com um tempo de agitação de 2 minutos. Combinar os dois extratos e transferir para funil de separação de 500 mL. Lavar com 30 mL de água ultrapura refrigerada. Descartar a camada aquosa. Evaporar o extrato clorofórmico em evaporador rotatório à temperatura de 35°C. Dissolver o resíduo em 2 mL de metanol, grau para cromatografia. Filtrar através de filtros com poros de diâmetro de 0,5 µm.

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Condições:

Fase Estacionária: Coluna de fase reversa Spherisorb ODS-2, 5 µm (250 x 4,6 mm)

Fase móvel: Metanol/água (80:20, v/v) com 300 mg de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/L

Vazão da fase móvel: 0,7 mL/min

Comprimento de onda do detector espectrofotométrico com arranjo de diodos: 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 µL

#### **3.9.4.2. Procedimento para determinação de CpA e TeA**

##### **Extração e limpeza**

Pesar 50 g de produto de tomate. Extrair com 150 mL de metanol por 3 minutos, em liquidificador de copo de aço a baixa velocidade. Filtrar em papel qualitativo sanfonado, lavando as paredes do copo com 50 mL de metanol adicionais.

Passar uma alíquota de 200 mL do filtrado para um funil de separação 500 mL. Adicionar 40 mL de hexano e agitar por 1 minuto. Descartar a camada de hexano. Acidificar o extrato metanólico até pH 2 com HCl 6 M. Realizar duas partições com 40 mL de clorofórmio com um tempo de agitação de 2 minutos.

Combinar os extratos clorofórmicos e transferir para funil de separação de 500 mL. Lavar com 30 ml de água ultrapura refrigerada. Descartar a camada aquosa. Evaporar o extrato clorofórmico em evaporador rotatório a temperatura de 35°C. Dissolver o resíduo em 2 mL de metanol, grau para cromatografia. Filtrar através de filtros com poros de 0,5 µm de diâmetro.

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Condições:

Fase Estacionária: Coluna de fase reversa Spherisorb ODS-2, 5 µm (250 x 4,6 mm)

Fase móvel: Metanol/água (90:10, v/v) com 300 mg de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/L

Vazão da fase móvel: 0,8 mL/min

Comprimento de onda do detector espectrofotométrico com arranjo de diodos: 280 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 µL

### **3.10. Avaliação da Metodologia**

Os métodos desenvolvidos foram avaliados segundo os testes recomendados pela AOAC International, para avaliações intralaboratoriais de métodos, ou seja, robustez, repetibilidade e recuperação (WERNIMONT, 1985). Foram também estabelecidos os limites de detecção para cada micotoxina.

#### **3.10.1. Robustez**

Para avaliar a sensibilidade dos métodos propostos a pequenas alterações nas condições de análise e nos reagentes empregados utilizou-se um plano fatorial fracionário, denominado teste de robustez (WERNIMONT, 1985). Foram



selecionados sete fatores, considerando-se para cada um, uma condição básica e uma condição alternativa, listadas nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Condições básicas e alternativas no teste de robustez para o método proposto para a determinação de alternariol e alternariol monometil éter.

Condições avaliadas	Condição básica	Condição alternativa
A-Marca do solvente de extração	Merck	Grupo Química
B-Volume do solvente de extração (mL)	150+50	200
C-Concentração do sulfato de amônia (% m/v)	10	8
D-Marca do clorofórmio	Merck	Grupo Química
E-Volume de clorofórmio na partição (mL)	40+40	50+30
F-Volume de água na limpeza do extrato clorofórmico (mL)	30	50
G-Temperatura de secagem do extrato (°C)	35	40

Tabela 7. Condições básicas e alternativas no teste de robustez para o método proposto para a determinação de ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico.

Condições avaliadas	Condição básica	Condição alternativa
A-Marca do solvente de extração	Merck	Grupo Química
B-Marca do hexano	Merck	Synth
C-Volume de hexano (mL)	40	50
D-Marca do clorofórmio	Merck	Grupo Química
E-Volume de clorofórmio na partição (mL)	40+40	50+30
F-Volume de água na limpeza do extrato clorofórmico (mL)	30	50
G-Temperatura de secagem do extrato (°C)	35	40

As variáveis foram combinadas de oito maneiras diferentes. Em um dos testes, todas as condições básicas (letra maiúscula) foram mantidas, e nos sete demais utilizou-se quatro condições alternativas (letra minúscula) e três condições básicas para cada teste, de acordo com o esquema:

1-ABCDEFg

2-ABcDefg

3-AbCdEfg

4-AbcdeFG

5-aBCdeFg

6-aBcdEfG

7-abCDefG

8-abcDEFg

Os testes foram realizados separadamente para cada micotoxina. Como amostra empregou-se produto de tomate (suco de tomate) previamente analisado no qual as micotoxinas não foram detectadas. Quantidades definidas de alternariol, alternariol monometil éter, ácido tenuazônico e ácido ciclopiazônico foram acrescentadas ao suco de tomate.

### 3.10.2. Recuperação

A avaliação da recuperação foi baseada no procedimento descrito por WERNIMONT (1985). As amostras de produto de tomate não contaminadas foram fortificadas com alíquotas de padrões de AME, AOH, CpA e TeA em sete níveis

diferentes e em duplicata, separadamente. Procedeu-se a extração, limpeza e quantificação de cada toxina pelos métodos propostos.

### **3.10.3. Repetibilidade**

#### **3.10.3.1. Repetibilidade das amostras contaminadas artificialmente**

A repetibilidade foi testada em amostras contaminadas artificialmente com vários níveis de AME, AOH, CpA e TeA e analisadas em duplicata de acordo com os métodos propostos para cada micotoxina.

#### **3.10.3.2. Repetibilidade das amostras naturalmente contaminadas**

As amostras, cuja contaminação foi constatada durante levantamento realizado, foram analisadas em duplicata e os coeficientes de variação das determinações foram utilizados para avaliar a repetibilidade dos métodos.

### **3.10.4. Curvas Padrão**

As curvas de calibração, para AME, AOH, CpA e TeA, foram elaboradas separadamente utilizando-se sete soluções metanólicas de concentrações variadas (WERNIMONT, 1985). Foram realizadas três injeções de cada um dos sete níveis e calculados os coeficientes de variação das áreas obtidas.

## 4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Testes de derivação química

O objetivo dos testes de derivação foi o de obter derivados das toxinas, passíveis de serem utilizados para a confirmação de sua identidade. A derivação química é talvez o enfoque mais simples e acessível ao analista dentre os vários aceitos para confirmação de identidade de compostos. Tal confirmação pode ser obtida por espectrometria de massas, espectrometria ultravioleta/visível, espectrometria no infravermelho, derivação química e imuno afinidade. A ressonância nuclear magnética é uma técnica de confirmação muito importante em química de produtos naturais e em síntese orgânica, porém sem aplicação significativa em análise de traços em alimentos. Em cromatografia à líquido, o uso de detectores de comprimento de onda fixo ou variável obriga o analista recorrer aos métodos confirmatórios. Como estes instrumentos ainda são os mais comumente utilizados, uma reação de derivação simplificaria o trabalho envolvido.

#### 4.1.1. Derivação com o cloreto de dansila

Os produtos de reação, obtidos pelo procedimento de LAWRENCE & FREI (1976) para dansilação direta utilizando os padrões de AME, AOH, CpA e TeA, isoladamente, foram analisados por CLAE empregando coluna de sílica e como fase móvel misturas de hexano/isopropanol (95:5, 9:10 e 85:15, v/v).

A comparação de cromatogramas obtidos para os quatro padrões de micotoxina demonstrou que não houve a formação de derivados dansilados característicos. O monitoramento dos produtos da reação de dansilação em espectrofotômetro na faixa de 190 a 550 nm não indicou a formação de derivados. A comparação dos espectros dos produtos de reação não demonstrou a presença de produtos com espectro diferenciáveis um dos outros.

#### 4.1.2. Derivação com o 2,4 dinitrofenilhidrazina

A derivação citada por HENRI *et alii* (1971) foi testada com AME, AOH, CpA e TeA isoladamente. TeA e CpA apresentam dois grupos carbonila nas suas estruturas e AOH e AME, por sua vez, apresentam um grupo carbonila. No entanto, todos os quatro compostos não formaram d derivados característicos com 2,4-DNP nas condições empregadas.

Os produtos de reação foram analisados por CLAE com coluna de fase reversa C<sub>18</sub> e fase móvel metanol/água (90:10, v/v) e monitorados em espectrofotômetro na faixa de 190 a 550 nm. Não houve indicação da formação de derivados característicos ao comparar os espectros obtidos para os padrões antes e depois da reação e do reagente de derivação.

ROSETT *et alii* (1957) observaram que o reagente de Brady originou um precipitado amorfo com o ácido tenuazônico, que foi caracterizado como uma mistura contendo algumas 2,4 dinitrofenilhidrazonas do ácido. O TeA pode ter reagido com 2,4-DNP, mas a possibilidade de formação de vários derivados inviabiliza a utilização da reação como prova de identidade.

#### 4.1.3. Metilação usando trifluoreto de boro como catalizador

A metilação usando como catalisador trifluoreto de boro não forneceu resultados satisfatórios para AME, AOH, CpA e TeA. A análise dos produtos de metilação por CLAE em coluna de fase reversa e fase móvel metanol/água (90:10, v/v) com 150 mg de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/L a 280 nm não demonstrou a formação de derivados característicos. O monitoramento em espectrofotômetro dos produtos das reações com os padrões e a comparação dos espectros obtidos não demonstraram a formação de derivados que permitam a confirmação da identidade destas micotoxinas.

#### 4.2. Estabilidade dos padrões de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico frente a temperatura

Os produtos de tomate durante o processamento são submetidos a temperaturas acima de 90°C, seja na etapa de concentração (extrato, polpa e purê) ou na pasteurização (tomates pelados e suco). Por esta razão, um teste de estabilidade dos padrões foi realizado aquecendo-se soluções metanólicas destes em banho-maria a 90°C por 30 minutos.

A estabilidade dos padrões foi avaliada comparando-se os cromatogramas obtidos por CLAE antes e depois do tratamento térmico. A análise das soluções metanólicas dos padrões de alternariol (Figura 5) e de alternariol monometil éter (Figura 6) mantidos sob aquecimento demonstrou que não houve a formação de nenhum outro composto.

A comparação dos cromatogramas obtidos para o ácido ciclopiazônico antes e depois do tratamento térmico (Figura 7) revelou a formação de mais de um composto. Este resultado pode ser devido a separação de alfa e beta ácido ciclopiazônico. A existência destes dois isômeros foi relatada por BEVERIDGE *et alii* (1988) ao separar alfa e beta ácido ciclopiazônico em coluna de sílica gel.

O ácido tenuazônico também apresentou modificação na separação cromatográfica antes e depois do aquecimento (Figura 8). Foi observado o aparecimento de um ombro no cromatograma da solução metanólica de TeA aquecida, o que pode indicar a presença de isômero. ROSETT *et alii* (1957) caracterizaram quimicamente os ácidos tenuazônico e isotenuazônico. Posteriormente, foi demonstrado que o ácido isotenuazônico era uma mistura de ácido tenuazônico e um isômero (STICKINGS, 1959). Porém, STEYN & RABIE (1976) relataram que o ácido isotenuazônico é uma mistura de três isômeros do ácido tenuazônico. A presença do TeA e ácido isotenuazônico foi determinada, por CG, em extrato de tomate, mas utilizando CLAE com coluna de troca aniônica não foi possível separar os isômeros do TeA (SCOTT & KANHERE, 1980).

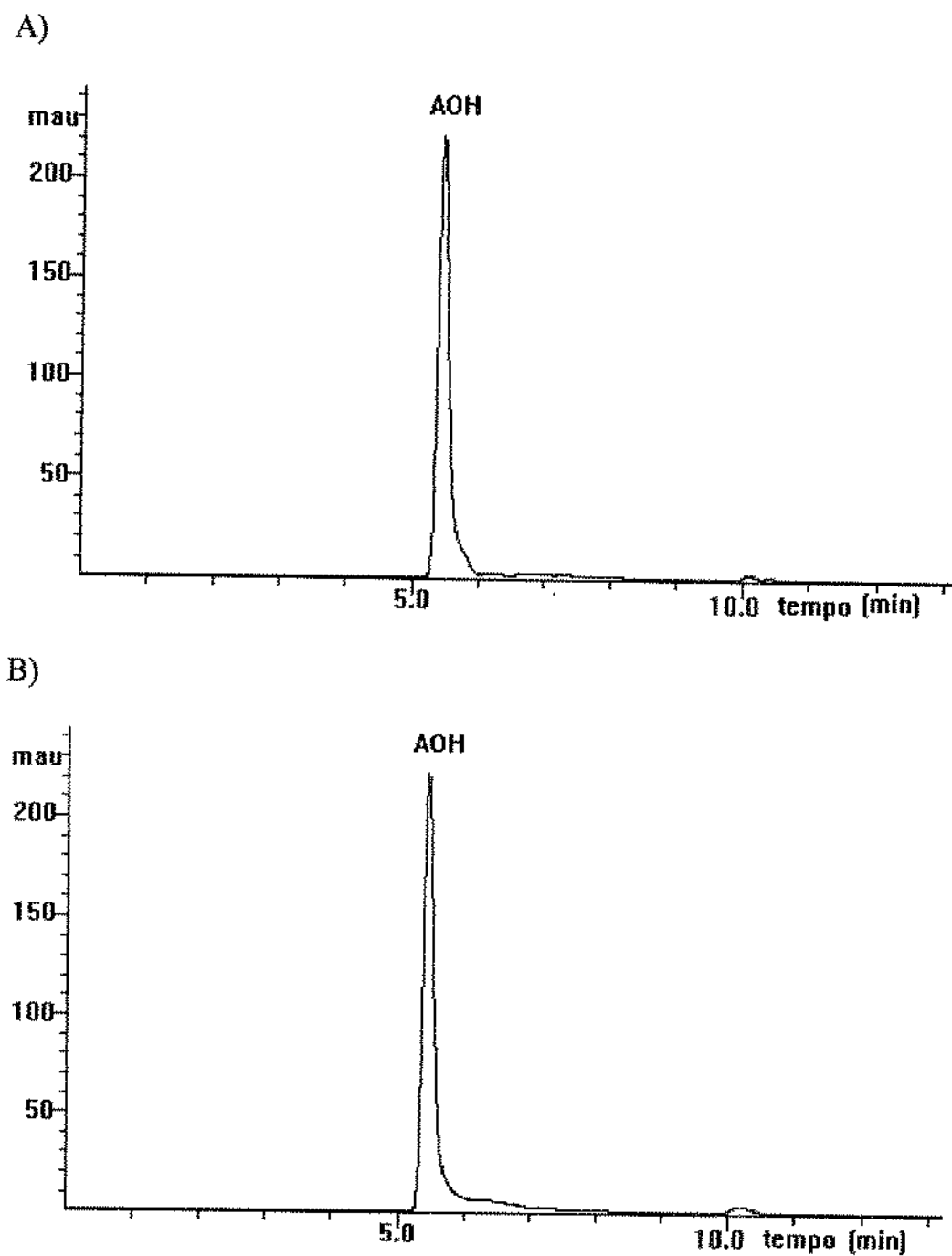


Figura 5 . Perfil cromatográfico do padrão de alternariol antes (A) e após aquecimento (B) a 90°C por 30 min

Condições: Coluna: Spherisorb ODS-2, 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm  
Fase móvel: Metanol/água (80:20, v/v) com 300 mg de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/L

Vazão: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodos a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20  $\mu$ L



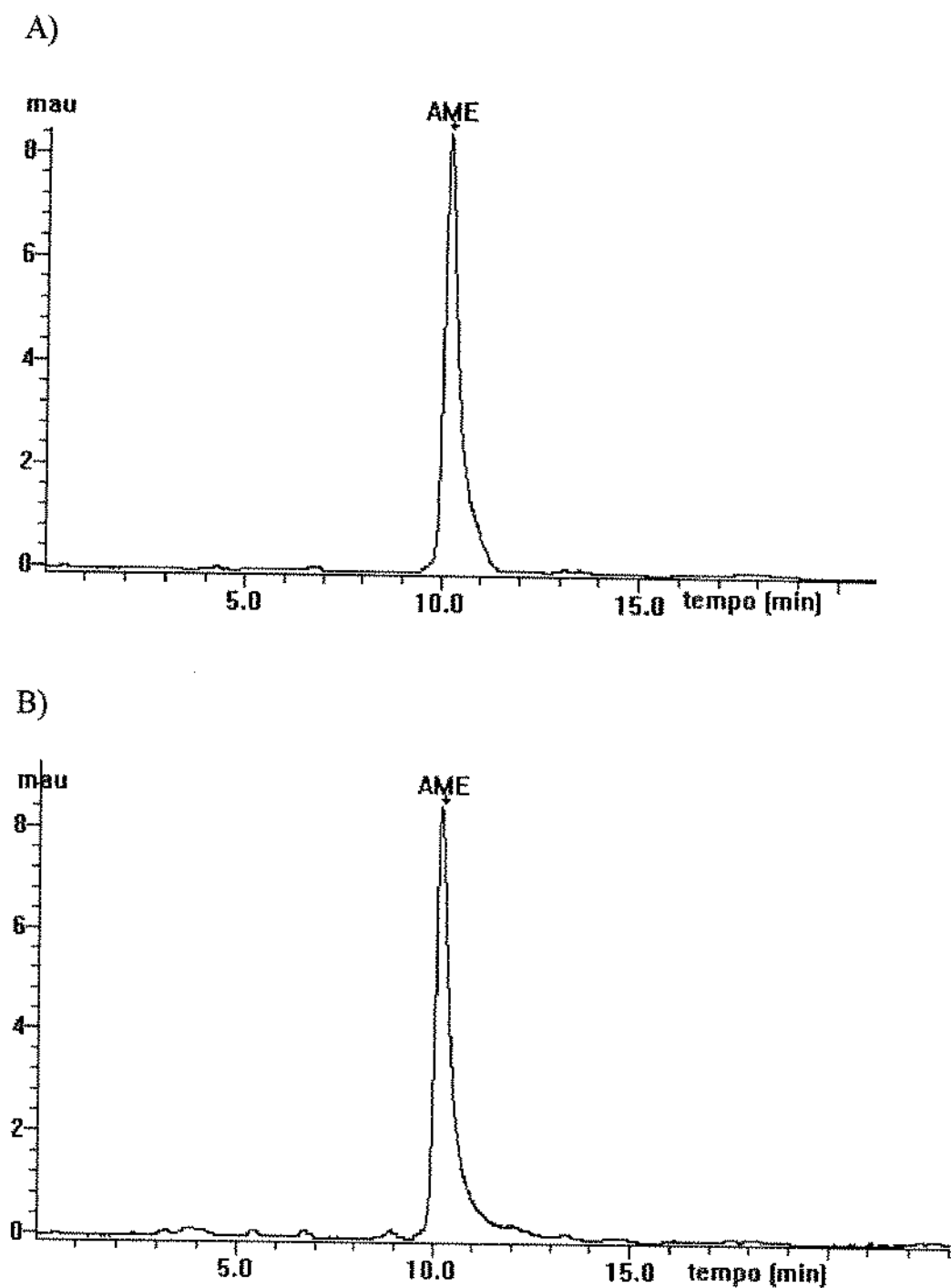


Figura 6 . Perfil cromatográfico do padrão de alternariol monometil éter antes (A) e após (B) aquecimento a 90°C por 30 min

Condições: Coluna: Spherisorb ODS-2, 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm  
Fase móvel: Metanol/água (80:20, v/v) com 300 mg de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/L

Vazão: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodos a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20  $\mu$ L

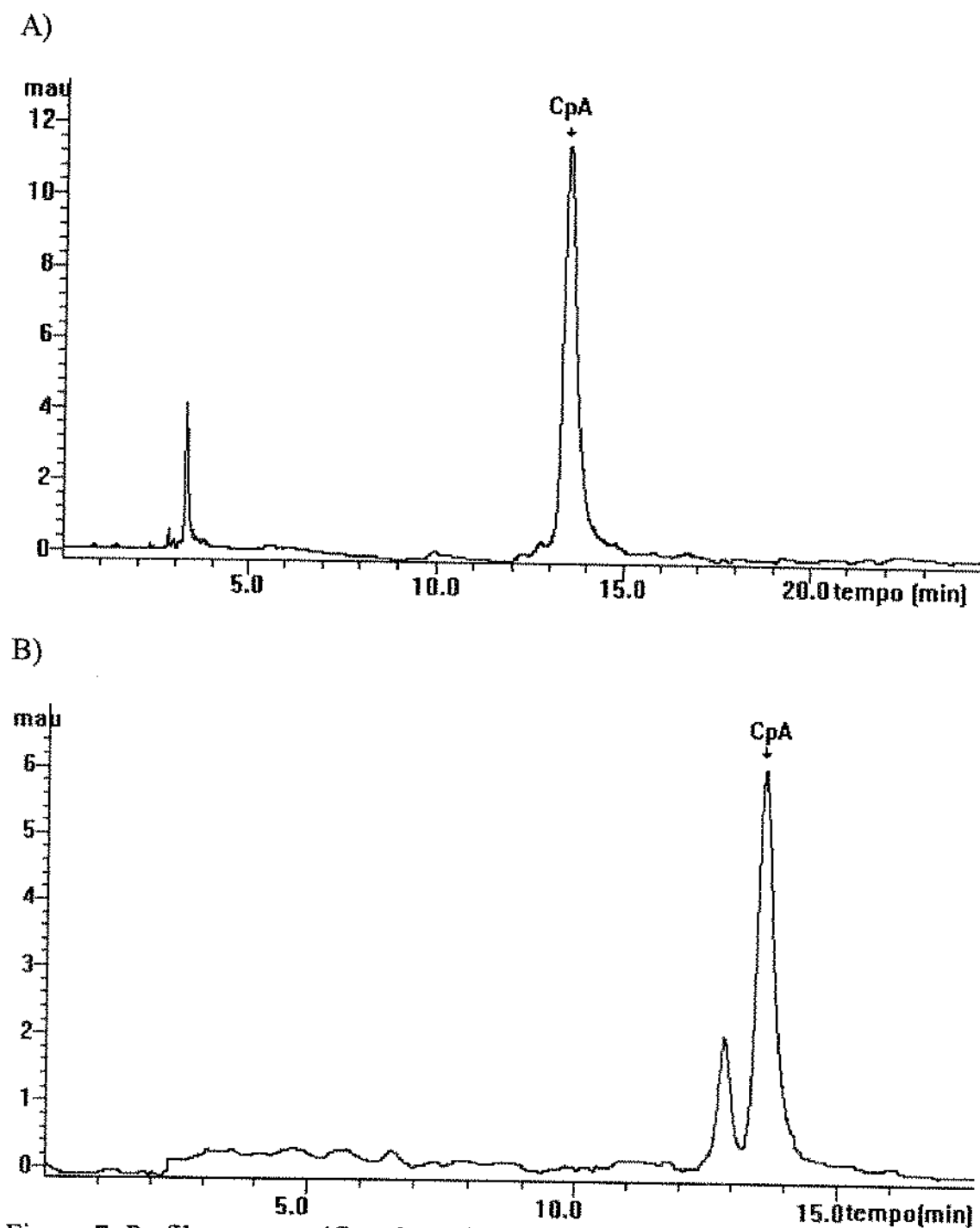


Figura 7. Perfil cromatográfico do padrão de ácido ciclopiazônico antes (A) e depois (B) do tratamento térmico

Condições: Coluna: Spherisorb ODS-2, 5  $\mu$ m 250 x 4,6 mm

Fase móvel: Metanol/água (90:10, v/v) com 300 mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O/L$

Vazão: 0,8 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de díodos a 280 nm

Quantidade de amostra injetada: 20  $\mu$ L

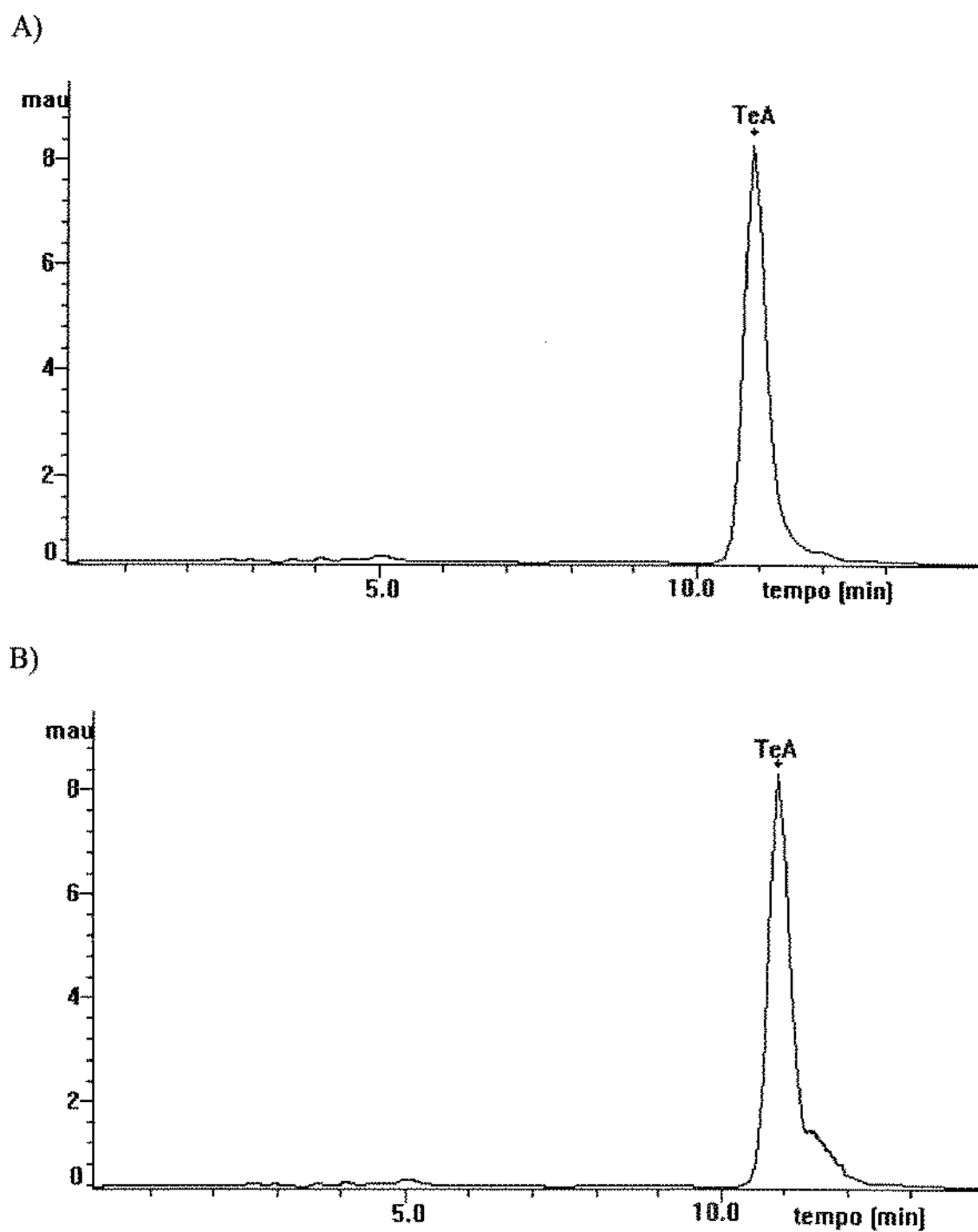


Figura 8. Perfil cromatográfico do padrão de ácido tenuazônico antes (A) e depois (B) do tratamento térmico

Condições: Coluna: Spherisorb ODS-2, 5  $\mu\text{m}$ , 250x4,6 mm

Fase móvel: Metanol/água (90:10, v/v) com 300 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/L}$

Vazão: 0,8 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodos a 280 nm

Quantidade de amostra injetada: 20  $\mu\text{L}$

### **4.3. Desenvolvimento de metodologia para determinação de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico por cromatografia à líquido**

#### **4.3.1. Extração e limpeza de produtos de tomate**

Para a extração e limpeza optou-se pela utilização de etapas simples e rápidas, fatores estes importantes, por um lado, para que o método tenha emprego nas diversas condições laboratoriais dentro do território nacional. Por outro lado, sistemas de limpeza com várias etapas ou mais complexos, implicam forçosamente numa recuperação mais baixa e no aumento do tempo gasto na análise.

A etapa de limpeza do extrato metanólico foi determinante para o desenvolvimento de dois procedimentos diferentes para a determinação de AME/AOH e CpA/TeA. A clarificação do extrato metanólico com sulfato de amônia afetou a recuperação de CpA e TeA, mas não interferiu na análise de AME e AOH. Entretanto, a limpeza do extrato pela partição com hexano provocou uma perda de AME numa faixa de 29 a 40%, sendo que não afetou a recuperação de CpA e TeA. SEITZ *et alii* (1975a) relataram que a extração com hexano removeu 29% de AME do extrato metanólico, sendo que o AOH não foi removido pelo hexano. Para determinar a concentração final do AME no extrato foi utilizado um fator de correção de 1,4. No presente trabalho não foi possível fazer o ajuste da concentração de AME porque não se obteve um valor constante para a remoção da toxina.

#### **4.3.2. Otimização dos procedimentos 14 e 15**

Nos procedimentos para determinação de AOH e AME (procedimento 14) e determinação de TeA e CpA (procedimento 15) foram realizados testes preliminares para se obter uma melhor extração e quantificação.

#### **4.3.2.1. Adequação da relação entre a quantidade de amostra e do volume de solvente extrator**

As relações testadas foram 3:1 e 4:1 para o volume de solvente e a quantidade de amostra. A razão 4:1 (200 mL de solvente para 50 g de amostra) foi a que produziu melhor resultado na extração. Um volume menor de solvente (3:1), além de fornecer um extrato muito concentrado contendo maior carga de interferentes, apresentava menor recuperação das micotoxinas presentes na amostra.

Optou-se por separar parte do volume (50 mL) usado na extração e usá-lo para lavar as paredes do copo do liquidificador para garantir uma maior eficiência na transferência de material na etapa de extração.

#### **4.3.2.2. Limpeza do extrato metanólico**

No procedimento para determinação de AME e AOH, testou-se a adição de Celite (terra diatomácea) juntamente com o sulfato de amônia na etapa de clarificação do extrato metanólico da amostra. A Celite facilitou a precipitação dos pigmentos originando um filtrado mais límpido. Porém as impurezas presentes na Celite interferiram na análise cromatográfica. Portanto, optou-se pela clarificação apenas com o sulfato de amônia.

A partição com hexano foi empregada no procedimento para determinação de CpA e TeA na limpeza do extrato metanólico. Foram testados diferentes tempos de partição. O tempo de um minuto de agitação na partição demonstrou ser adequado para a limpeza do extrato, sem comprometer a análise cromatográfica pela presença de interferentes.

#### **4.3.2.3. Volume de clorofórmio usado na partição**

Testes preliminares indicaram que um volume de 80 mL de clorofórmio era adequado para a partição nos procedimentos para determinação de AME/AOH e CpA/TeA. A divisão do volume em duas frações de 40 mL garantiu maior eficiência da partição das micotoxinas para a camada de clorofórmio.

#### **4.3.2.4. Tempo de partição**

O tempo de agitação em funil de separação do extrato metanólico com clorofórmio demonstrou ser importante na eficiência da partição. Foi feita a análise cromatográfica dos extratos de clorofórmio obtidos com 1, 2 e 3 minutos de agitação. O melhor resultado foi obtido com o tempo de 2 minutos, sendo que 3 minutos não aumentou a eficiência da partição.

#### **4.3.2.5. Limpeza do extrato clorofórmico**

Foi necessário fazer uma partição do extrato clorofórmico com água para limpeza deste. A temperatura da água e a sua pureza foram de grande importância nesta etapa. A água na temperatura ambiente (25°C) levou a formação de emulsão com o extrato clorofórmico. Passou-se a utilizar água refrigerada (15 a 18°C). Por tratar-se de análise de composto em baixas concentrações, as impurezas presentes na água destilada poderiam ser arrastadas para a camada de clorofórmio interferindo na análise cromatográfica. Portanto trabalhou-se com água purificada no Milli Q.

#### 4.3.3. Otimização das condições para eluição e detecção das toxinas em cromatografia à líquido.

O comportamento dos padrões de AME, AOH, CpA e TeA foi avaliado testando-se diferentes condições cromatográficas. As colunas de fase reversa ODS-1 (15 cm) e ODS-2 (25 cm) foram testadas com diferentes fases móveis em sistema isocrático (Tabela 5). Independente da coluna analítica usada, nas análises por CLAE foram utilizadas coluna de guarda e uma pré-coluna (coluna de saturação) recheada com sílica antes da válvula de injeção. Esta coluna satura a fase móvel com sílica, o que retarda a dissolução da sílica da coluna analítica (ENGELHARDT, 1986).

Fases móveis contendo combinações de metanol e água isentos de sulfato de zinco mostraram, em alguns casos, capacidade de separação para os padrões de AME e AOH. Mas somente as fases móveis metanol/água contendo sulfato de zinco apresentaram boa separação para Cpa e TeA.

Na cromatografia líquida de complexação, a formação rápida e reversível de complexos entre íons metálicos e compostos orgânicos que funcionam como doadores de elétrons, pode ser usada para ajustar o tempo de retenção e a seletividade da separação cromatográfica (POOLE & SCHUETTE, 1984). A adição do íon metálico zinco à fase móvel metanol/água foi testada em diferentes concentrações para os padrões de AME, TeA e CpA (Tabela 8).

A presença do íon metálico zinco na fase móvel, praticamente não alterou os valores de tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) e do fator de retenção ( $k$ ) para o padrão de AME, mas apresentou efeito significativo nos  $t'_R$  e  $k$  para TeA e CpA (Figura 9). Para TeA e CpA, o aumento da concentração do íon zinco levou à redução do tempo de retenção ajustado e do fator de retenção. A complexação do íon zinco com TeA e CpA promoveu um aumento no caráter hidrofílico do complexo comparado com os solutos originais. Portanto, na ausência do íon zinco, o TeA e CpA são praticamente insolúveis na fase móvel. À medida que aumenta a concentração do íon na fase móvel, reduz-se o tempo de retenção. Isto é devido à maior complexação das toxinas com o

íon metálico, o que traria maior afinidade pela fase móvel. Concentrações maiores do que 300 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$  não provocam redução significativa do tempo de retenção dos compostos. STACK *et alii* (1985) relataram que o TeA formou um forte complexo com  $\text{Zn}^{2+}$  que eluiu como um pico agudo na CLAE usando metanol/água (85:15, v/v) com 300mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$  como fase móvel.

O emprego de metais de transição nas fases móveis para a complexação com compostos iônicos ou ionizáveis representa um fator importante no aumento da seletividade para a CLAE com fase reversa. Na literatura cita-se o emprego de sulfato de zinco na determinação de AOH, AME, TeA (STACK *et alii*, 1985) e CpA (URANO *et alii*, 1992)

Tabela 8. Efeito da concentração de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sobre o tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) e fator de retenção (k), mantendo-se constante o tipo de coluna (ODS-2, 25 cm), a polaridade e vazão da fase móvel [Metanol/água (90:10, v/v), 0,8 mL/min].

Concentração $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}(\text{mg}/\text{L})$	Alternariol monometil éter		Ácido tenuazônico		Ácido ciclopiazônico	
	$t'_R$	k	$t'_R$	k	$t'_R$	k
0	2,6	0,90	-	-	-	-
50	2,6	0,90	14,5	5,00	21,7	7,48
100	2,7	0,93	10,7	3,69	16,5	5,69
150	2,6	0,90	9,6	3,31	14,6	5,03
300	2,7	0,94	8,83	3,04	13,3	4,59



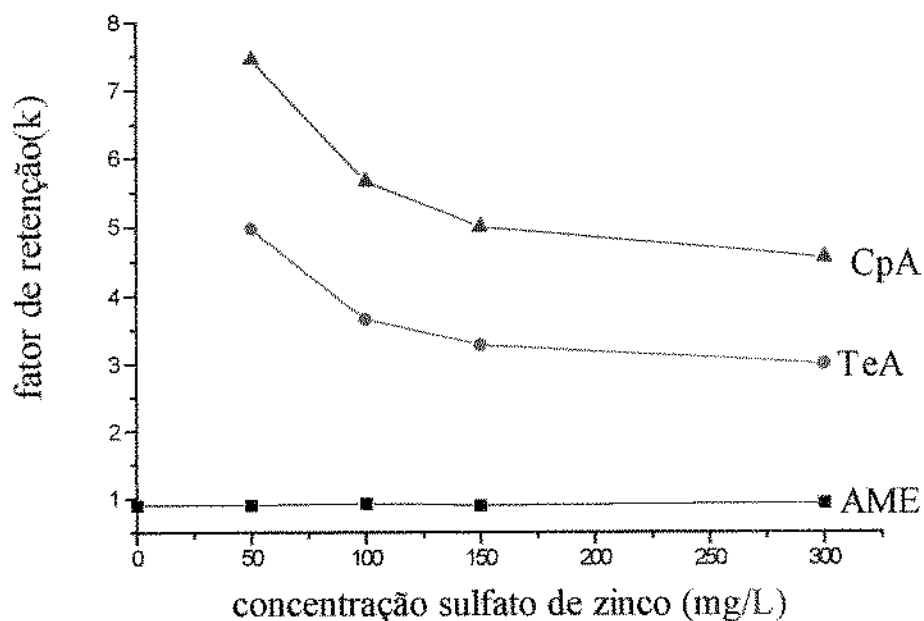


Figura 9. Efeito da concentração de sal metálico ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) sobre os fatores de retenção dos padrões de alternariol monometil éter, ácido tenuazônico e ácido ciclopiazônico.

Pelos dados da Tabela 9, verifica-se que na coluna ODS-1 (15 cm) o aumento da polaridade da fase móvel aumentou o tempo de retenção ajustado dos compostos e o valor do fator de retenção. Isto implica que uma fase móvel mais polar aumenta a interação dos compostos com a fase estacionária. Resultado semelhante foi relatado por HEISLER *et alii* (1980) que observaram aumento do valor de k para o AME numa faixa de 0,92 a 5,34 quando aumentaram a polaridade da fase móvel metanol e água (90:10, 80:20 e 65:35, v/v) usando coluna de fase reversa ( $\mu$ Bondapak, 10  $\mu$ m, 30 cm x 3,9 mm)

Na coluna ODS-2 (25 cm) nota-se que o tempo de retenção ajustado e o valor do fator de retenção diminuíram com o aumento da polaridade da fase móvel. Devemos considerar que esta coluna apresenta uma maior concentração de fase estacionária ligada que a coluna ODS-1 e nestas condições os compostos apresentam

maior afinidade pela fase móvel mais polar. Para o TeA foi relatado na literatura (HEISLER *et alii*, 1980) que o aumento de polaridade da fase móvel metanol/água acarretou uma redução do valor de  $k$  numa faixa de 3,7 a 1,4 usando coluna de fase reversa.

Independente da concentração de fase ligada, o aumento do comprimento da coluna, de 15 para 25 cm, provocou aumento do tempo de retenção ajustado e do fator de retenção dos compostos, sendo que para a fase móvel menos polar o efeito foi mais pronunciado. As duas colunas e as duas fases móveis permitem uma boa separação dos compostos. A escolha depende dos interferentes presentes nos extratos das amostras.

Tabela 9. Efeito da polaridade da fase móvel e o tamanho da coluna sobre o tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) e o fator de retenção ( $k$ ) (metanol/água, 300 mg  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O/L$ , vazão 1,0 mL/min)

Fase móvel	coluna ODS-1 (15 cm)						coluna ODS-2(25 cm)					
	AME		TeA		CpA		AME		TeA		CpA	
	$t'_R$	$k$	$t'_R$	$k$	$t'_R$	$k$	$t'_R$	$k$	$t'_R$	$k$	$t'_R$	$k$
95+5	0,9	0,47	5,2	2,72	6,7	3,50	3,5	1,40	9,1	3,64	11,8	4,72
90+10	1,0	0,54	5,4	2,9	7,1	3,8	2,1	0,83	5,4	2,13	7,9	3,12

O efeito da vazão sobre a velocidade de eluição dos compostos foi avaliada utilizando coluna ODS-1 (15 cm) e fase móvel metanol/água (90:10, v/v) com 300 mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O/L$ . Analisando-se os valores da Tabela 10, concluiu-se que o aumento da vazão da fase móvel de 0,8 para 1,0 mL/min, diminuiu o tempo de retenção dos três compostos, devido a maior velocidade de eluição destes na coluna.

Tabela 10. Efeito da vazão sobre o tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) e o fator de retenção ( $k$ ) mantendo-se fase móvel [metanol/água (90:10, v/v) com 300mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O/L$ ] e coluna (ODS-1, 15 cm) constantes

Vazão (mL/min)	Alternariol monometil éter		Ácido tenuazônico		Ácido ciclopiazônico	
	$t'_R$	$k$	$t'_R$	$k$	$t'_R$	$k$
0,8	1,3	0,57	4,7	2,04	6,3	2,74
1,0	1,0	0,53	4,0	2,11	5,2	2,74

Não foi possível obter um único sistema isocrático de fase móvel para a eluição simultânea das quatro micotoxinas em produtos de tomate. As condições definidas para AOH e AME foram: fase móvel com metanol/água (80:20, v/v) com 300 mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O/L$ , vazão 0,7 mL/min, comprimento de onda a 250 nm. Para TeA e CpA foram: fase móvel metanol/água (90:10, v/v) com 300 mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O/L$ , vazão 0,8 mL/min, comprimento de onda de 280 nm. Em ambos os casos, a coluna de fase reversa Spherisob ODS-2, (5  $\mu$ m, 25 cm) mostrou melhor desempenho do que a coluna de fase reversa Spherisorb ODS-1 (5  $\mu$ m, 15 cm), sendo essencial para a separação do AOH e AME dos interferentes encontrados em produtos de tomate.

#### 4.4. Avaliação do método proposto para determinação de alternariol e alternariol monometil éter

##### 4.4.1. Robustez

A sensibilidade do método proposto a pequenas variações nas condições e nos reagentes foi verificada utilizando combinações de condições básicas e alternativas apresentadas no item 3.10.1. (Tabela 6). A robustez do método foi determinada em separado para o AOH e para o AME estando expressa nas recuperações obtidas nas condições testadas (Tabelas 11 e 12) e na individualização dos fatores isolados (Tabela 13 e 14).

Tabela 11. Recuperação de alternariol nas condições do teste de robustez.

Condição teste	Recuperação (%)
1-ABCDEFGG	77,8
2-ABcDefg	77,0
3-AbCdEfg	107,5
4-AbcdeFG	108,9
5-aBCdeFg	80,1
6-aBcdEfG	92,8
7-abCDefG	77,9
8-abcDEFg	72,4

Tabela 12. Recuperação de alternariol monometil éter no teste de robustez.

Condição teste	Recuperação (%)
1-ABCDEFg	87,3
2-ABcDefg	89,5
3-AbCdEfg	87,7
4-AbcdeFG	82,8
5-aBCdeFg	87,5
6-aBcdEfG	88,4
7-abCDefG	88,8
8-abcDEFg	86,1

Tabela 13. Individualização da influência das condições avaliadas para o alternariol no teste de robustez.

Condições avaliadas	Média X <sup>a</sup>	Média Y <sup>b</sup>	Diferença <sup>c</sup>
A-Marca metanol	92,8	80,8	-12,0
B-Volume de metanol	81,9	91,7	9,8
C-Concentração de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	85,8	87,8	2,0
D-Marca CHCl <sub>3</sub>	76,3	97,3	21,0
E-Volume de CHCl <sub>3</sub>	87,6	86,0	-1,6
F-Volume de H <sub>2</sub> O	84,8	88,8	4,0
G-Temperatura	89,3	84,3	-5,0

<sup>a</sup>-Média das recuperações relativas a ensaios que possuem condição alternativa em comum.

<sup>b</sup>-Média dos resultados não incluídos na média X.

<sup>c</sup>-Diferença entre as médias X e Y.

Tabela 14. Individualização da influência das condições avaliadas para o alternariol monometil éter no teste de robustez.

Condições avaliadas	Média X <sup>a</sup>	Média Y <sup>b</sup>	Diferença <sup>c</sup>
A-Marca metanol	86,8	87,7	0,9
B-Volume de metanol	88,2	86,4	-1,8
C- Concentração de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	87,8	86,7	-1,1
D-Marca CHCl <sub>3</sub>	87,9	86,6	-1,3
E-Volume de CHCl <sub>3</sub>	87,4	87,1	-0,3
F-Volume de água	85,9	88,6	-2,7
G-Temperatura	86,8	87,7	0,9

<sup>a</sup>-Média das recuperações relativas a ensaios que possuem condição alternativa em comum.

<sup>b</sup>-Média dos resultados não incluídos na média X.

<sup>c</sup>-Diferença entre as médias X e Y.

Analisando os resultados separadamente para cada micotoxina, observou-se que na determinação de AOH a variável que apresentou maior influência foi a qualidade do clorofórmio usado na partição. A marca de metanol usado na extração, foi o segundo maior fator em importância, seguido pelo volume de metanol.

Para o AME, o volume de água usado na partição foi a condição que teve maior efeito estando em segundo o volume de metanol usado na extração. Nos dois testes a proporção de  $\text{CHCl}_3$  (40:40 ou 50:30, v/v) usado na partição foi o fator menos relevante.

Os resultados apresentados mostram que, mesmo utilizando um único método para determinar simultaneamente duas micotoxinas (AOH e AME), as condições que afetam a determinação devem ser avaliadas para cada uma das micotoxinas separadamente. A determinação do AME foi a menos susceptível a variações de procedimento, comparado a do AOH.

#### 4.4.2. Recuperação

As amostras de produto de tomate não contaminadas naturalmente, em duplicata, foram fortificadas com alíquotas de padrões de AOH e AME, em sete níveis diferentes, separadamente. Procedeu-se a extração, limpeza e quantificação de cada toxina pelo método descrito no item 3.9.4.1.

Foram determinadas a regressão linear e a dispersão para os resultados obtidos para recuperação de AOH e AME utilizando-se o modelo de YODEN (WERNIMONT, 1985). A regressão linear para o AOH (Figura 10) apresentou a equação  $Y = 0,6445 + 0,6845X$ , o coeficiente de correlação 0,7588 e o desvio padrão 0,3083. A dispersão e os desvios individuais estão representados na Figura 11. Para o AME, a equação da regressão linear (Figura 12) foi  $Y = 0,0025 + 0,9838X$ , o coeficiente de correlação 0,9987 e o desvio padrão 0,0451. Na Figura 13 temos a dispersão e o desvios individuais para a recuperação do AME. Comparando-se os



resultados, observa-se que para o AOH, o coeficiente de correlação foi bem menor do que o coeficiente de correlação para o AME. Também houve maior dispersão dos resultados na recuperação do AOH.

A análise de variância das recuperações definiu que para a recuperação de AOH existe diferença significativa ao nível de 5% entre as médias dos valores adicionados e dos valores encontrados. Existem várias razões que podem explicar a diferença, uma delas seria a presença de uma causa definida no método ou na amostra que estaria afetando diferentemente os vários níveis do analito usado na recuperação. A outra causa pode ser que a regressão verdadeira não seja linear, isto é, existem relações diferentes entre as concentrações maiores e menores ou as concentrações médias. Para a recuperação de AME não houve diferença significativa entre as médias dos valores adicionados e encontrados ao nível de 5% de significância. Ou seja o valor F calculado foi menor que o valor F tabelado, portanto aceita-se a hipótese que a verdadeira regressão entre valores adicionados e valores encontrados é linear.

Os valores de recuperação obtidos para AOH e AME empregando o método proposto são apresentados nas Tabela 15. As recuperações médias obtidas para AME (níveis de 16,2-65,0 ng/mL) e AOH (níveis de 62,5-92,5 ng/mL) foram de 98,7% e 84,1%, respectivamente. A menor recuperação média obtida foi de 76,6% para o AOH na concentração de 87,5 ng/mL e para o AME foi de 94,5% na concentração de 24,4 ng/mL. Amostras de sorgo fortificadas com níveis de 1 a 6 ppm apresentaram recuperações de  $82 \pm 10\%$  e  $70 \pm 12\%$  para AME e AOH, respectivamente, com detector de fluorescência (SEITZ & MOHR, 1976). STACK *et alii* (1985) relataram uma recuperação média de 68% para AME em produtos de tomate empregando CLAE e o mesmo tipo de detector. Com detector de arranjo de diodos PALMISANO *et alii* (1989a) obtiveram recuperações de 50 a 72% para AOH e de 73,5 a 76,0% para AME, numa faixa de concentração de 0,2 a 10,0 ng/g em amostras de gêneros alimentícios.

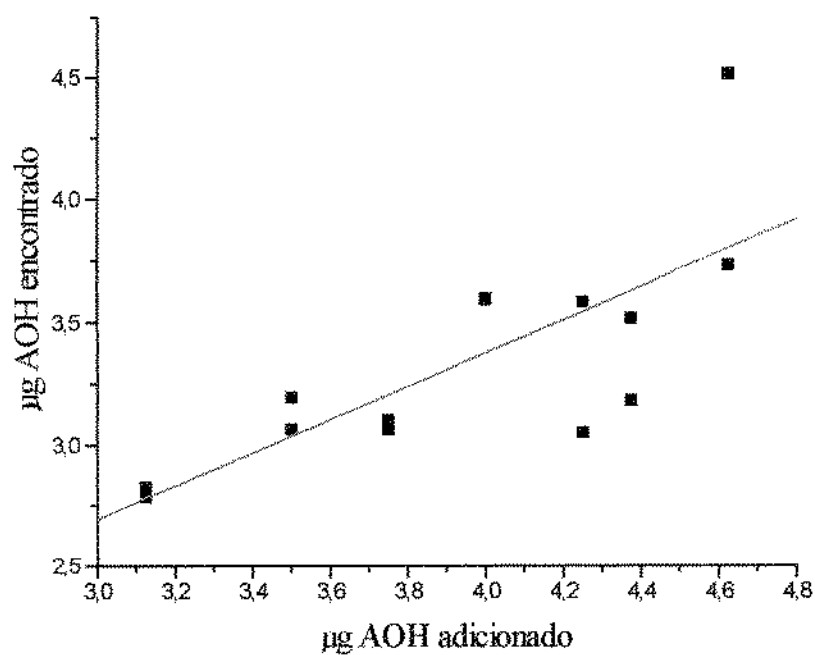


Figura 10. Regressão linear para a recuperação do alternariol.

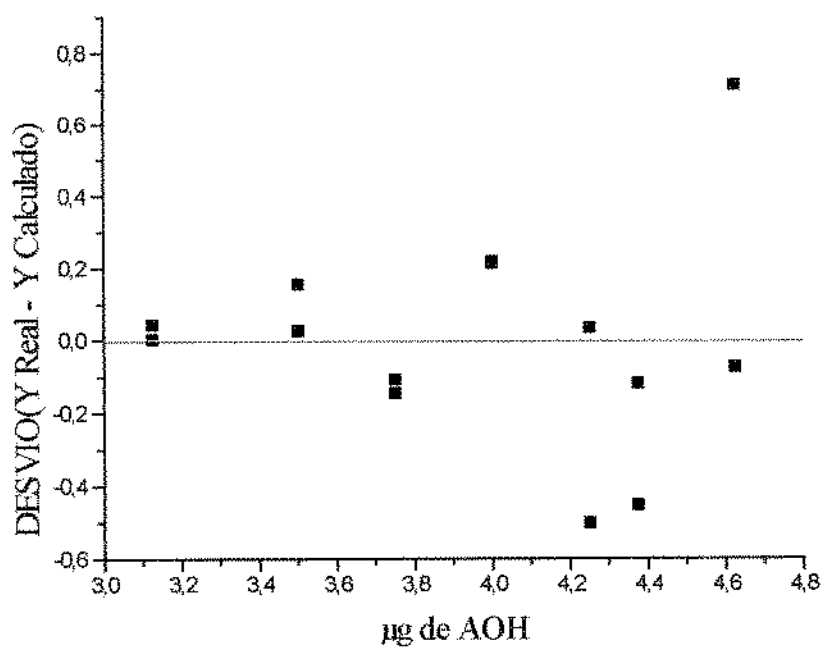


Figura 11. Dispersão e desvios individuais da recuperação de alternariol.

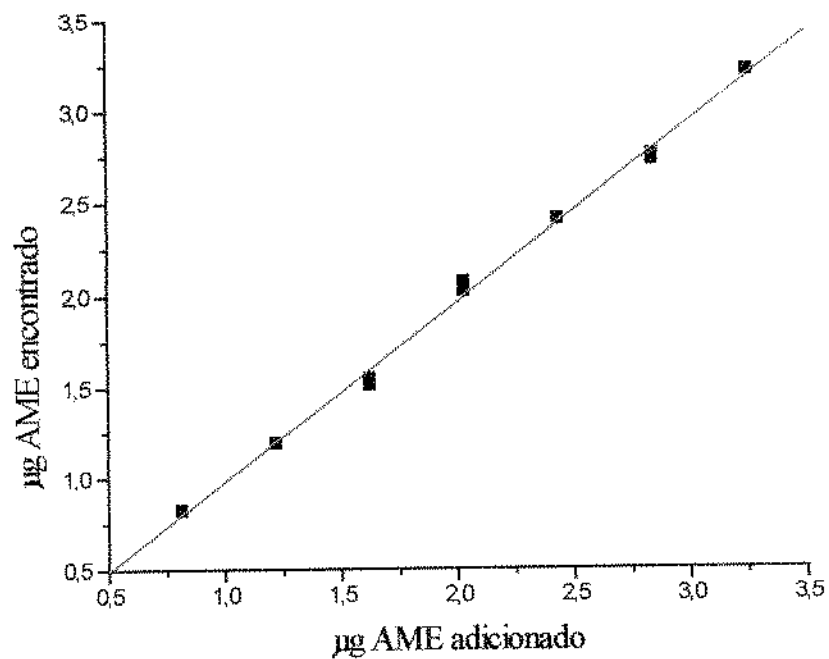


Figura 12. Regressão linear para a recuperação do alternariol monometil éter.

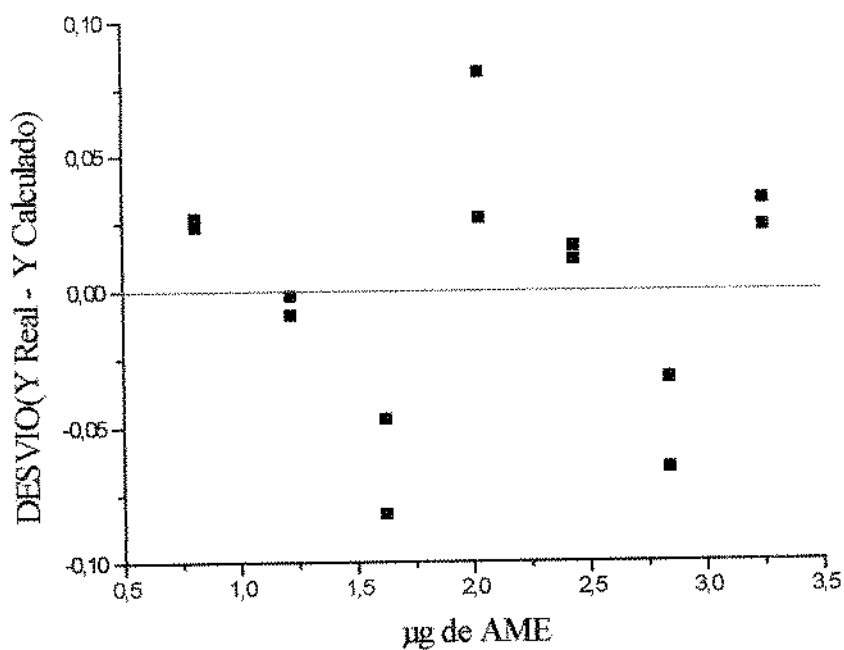


Figura 13. Dispersão e desvios individuais da recuperação de alternariol monometil éter.

Tabela 15. Recuperação de alternariol e alternariol monometil éter pelo método proposto.

Níveis	Alternariol			Alternariol monometil éter		
	Concentração (ng/mL) <sup>a</sup>	Recuperação (%)	C.V. (%)	Concentração (ng/mL) <sup>a</sup>	Recuperação (%)	C.V. (%)
1	62,5	89,8	1,0	16,2	101,7	0,2
2	70,5	89,5	2,9	24,4	98,2	0,4
3	75,0	82,3	0,9	32,5	94,5	1,7
4	80,0	90,0	0,1	40,6	101,1	1,8
5	85,0	78,1	11,4	48,7	99,1	0,2
6	87,5	76,6	7,0	56,8	96,7	0,8
7	92,5	82,3	14,6	65,0	99,4	0,2

<sup>a</sup>- Média de duplicatas

C.V.= coeficiente de variação

#### 4.4.3. Repetibilidade

A repetibilidade foi testada em amostras contaminadas artificialmente com vários níveis de AOH e AME, em duplicata, de acordo com o método descrito em 3.9.4.1.

O coeficiente de variação com relação às áreas medidas pelo detector entre injeções da mesma solução de padrão, no cromatógrafo à líquido, apresentou uma faixa de 3,5% a 23,3% para alternariol e 0,4% a 21,3% para o alternariol monometil éter.

Os valores obtidos para verificar a repetibilidade nas amostras artificialmente contaminadas estão na Tabela 15 como coeficientes de variação. Para o AOH o coeficiente de variação está na faixa de 0,1 a 14,6% (CV médio = 5,4%) e para o AME a faixa foi de 0,2 a 1,8% (CV médio = 0,8%). Pelos resultados apresentados percebe-se que o coeficiente de variação de AOH foi em torno de 7 vezes maior que o encontrado para AME. Não foi possível comparar a repetibilidade com amostras naturalmente contaminadas pois no levantamento de incidência, estas micotoxinas não foram detectadas em nenhuma amostra.

A precisão do método desenvolvido por HEISLER *et alii* (1980) foi determinada utilizando-se uma série de 10 determinações de AME e AOH. Os valores obtidos para o coeficiente de variação foram 1,9 e 4,7% para AOH e AME, respectivamente. Pelos dados apresentados verifica-se que o método desenvolvido neste estudo apresentou melhor precisão para a determinação de AME (CV = 0,8%), mas para a determinação de AOH os dois métodos apresentaram valores próximos, isto é um CV = 5,4% para o nosso método e um CV = 4,7% para o método de HEISLER *et alii* (1980). WITTKOWSKI *et alii* (1983) relataram uma repetibilidade de 73 e 82% para AOH e AME, respectivamente, em produtos comerciais derivados de frutas e vegetais (inclusive tomate).

#### 4.4.4. Limite de detecção

Para o limite de detecção o conceito que recomenda tomar 3 vezes o desvio padrão da linha de base (ACS, 1980), foi abandonado, assim como o conceito de detectabilidade mínima (D) que é específico para cromatografia e pode ser expresso em concentração ou massa do analito, sendo  $D=2N/S$  (N é o valor do ruído e S é a sensibilidade do detector para o composto em análise) (IUPAC, 1993). Fazendo uso destes conceitos ampliações na sensibilidade do detector de  $10^{-13}$  para o alternariol e para o alternariol monometil éter podem ser empregadas para registrar os picos, porém, não é possível obter um espectro reconhecível das substâncias. No nosso entender não serve a nenhum propósito útil, detectar uma substância cuja identidade não pode ser confirmada. Assim, optamos por considerar limite de detecção a menor quantidade em que a toxina pode ser, além de quantificada, também confirmada pelo detector de arranjo de diodos. Para o AOH e para o AME, os limites de detecção dos padrões puros nas condições de trabalho descritas em 3.9.4.1. são 1,0 ng e 0,6 ng, respectivamente.

Os limites de detecção do método para AOH e AME, em produtos de tomate, são 5,0 ng/g e 2,0 ng/g, respectivamente. STACK *et alii.* (1985) obtiveram um limite de detecção de 3,0 ng/g para AME em produto de tomate empregando CLAE e detector de fluorescência. Para amostras de sorgo os limites de detecção para AME e AOH foram de 1-2 ng e 10 ng com os detectores de fluorescência e ultravioleta, respectivamente (SEITZ & MOHR, 1976). O limite de detecção para AME no método aqui desenvolvido foi menor do que o citado por STACK *et alii* (1985)

#### 4.4.5. Curva Padrão

As curvas de calibração, para AOH e AME, foram elaboradas utilizando-se sete soluções metanólicas de concentrações variadas (Tabela 16). As faixas de linearidade foram de 7 a 300ng para AOH e de 11 a 241 ng para AME. SEITZ & MOHR (1976) relataram uma faixa de linearidade de 5 a 850 ng para AOH e AME usando detectores

de fluorescência e espectrofotométrico no ultravioleta maior do que a obtida no presente trabalho. As Figuras 14 e 15 mostram as curvas de calibração para AME e AOH, respectivamente

A partir dos valores obtidos, foi calculada a regressão linear e determinou-se que  $y = 9,0044x - 92,4177$  ( $r = 0,9931$ ) para AME e  $y = 13,4946x + 67,1058$  ( $r = 0,9995$ ) para AOH. De posse dos dados calculou-se o limite de confiança para cada curva (WERNIMONT, 1985) e concluiu-se que as retas passavam pela origem ( $x=0$  e  $y=0$ ). As equações utilizadas para determinar as concentrações de AME e AOH, a partir das área relativas obtidas, foram  $y = 9,0044x$  e  $y = 13,4946x$ , respectivamente

Tabela 16. Faixa de linearidade e coeficiente de variação para alternariol e alternariol monometil éter.

Micotoxina	Faixa de linearidade (ng)	Coefficiente de variação médio (%)
Alternariol	7-300	3,04
Alternariol monometil éter	11-241	1,83

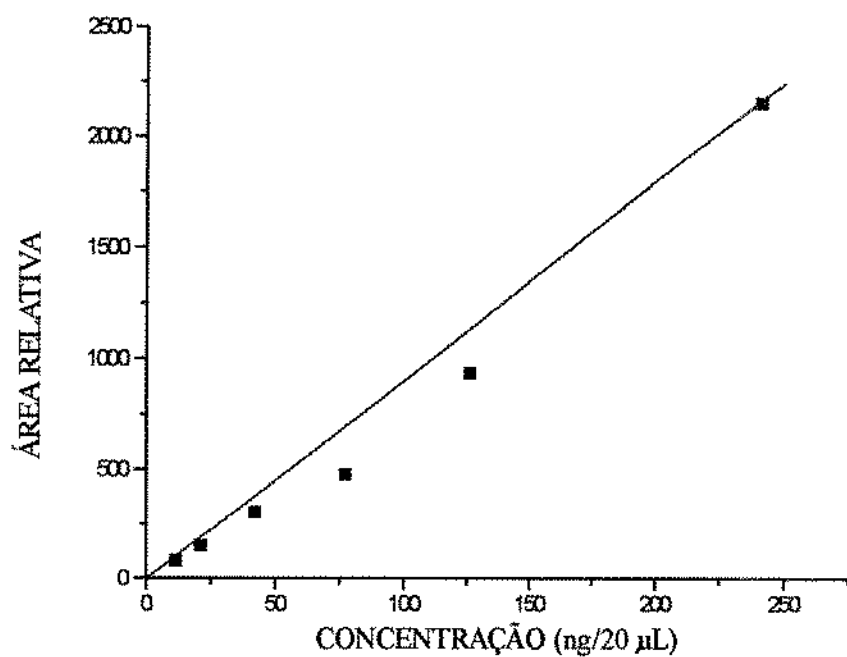


Figura 14. Curva padrão do alternariol monometil éter,  $CV_{\text{méd}} = 1,8\%$  (0,93-3,35%) e  $Y=9,0044X$ .

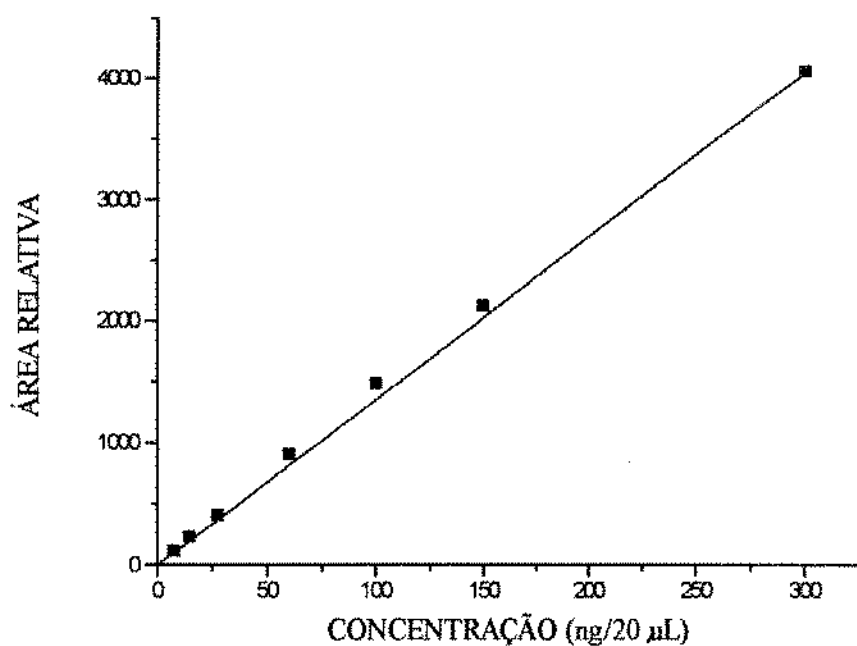


Figura 15. Curva padrão do alternariol,  $CV_{\text{méd}} = 3,0\%$  (1,23-5,56%) e  $Y=13,4946X$ .



## **4.5. Avaliação do método proposto para determinação de ácido tenuazônico e ácido ciclopiazônico**

### **4.5.1. Robustez**

Na adequação do procedimento para determinação dos ácidos tenuazônico e ciclopiazônico em produtos de tomate, verificou-se que as etapas críticas para a quantificação eram a qualidade dos solventes usados na extração e partição.

A robustez dos método para as duas micotoxinas foi avaliada nas concentrações obtidas (Tabelas 17 e 18) e diferenças nas combinações de condições testadas para CpA (Tabela 19) e TeA (Tabela 20).

Pelos resultados da diferença entre as médias X e Y concluiu-se que a marca do metanol usado na extração para a determinação de CpA demonstrou ser a variável de maior importância, seguido pela temperatura de secagem do extrato. Na avaliação para TeA os fatores de maior importância foram as marcas do clorofórmio e do metanol, nesta ordem. Já a temperatura de secagem foi o fator que apresentou menor influência.

Tabela 17. Recuperação do ácido ciclopiazônico no teste de robustez.

Condição teste	Recuperação (%)
1-ABCDEFG	93,3
2-ABcDefg	99,8
3-AbCdEfg	99,4
4-AbcdeFG	96,8
5-aBCdeFg	96,3
6-aBcdEfG	81,7
7-abCDefG	85,4
8-abcDEFg	84,3

Tabela 18. Recuperação do ácido tenuazônico no teste de robustez.

Condição teste	Recuperação (%)
1-ABCDEFG	89,5
2-ABcDefg	87,6
3-AbCdEfg	82,1
4-AbcdeFG	84,9
5-aBCdeFg	77,7
6-aBcdEfG	81,5
7-abCDefG	84,9
8-abcDEFg	89,9

Tabela 19. Individualização da influência das condições avaliadas para o ácido ciclopiazônico no teste de robustez.

Condições avaliadas	Média X <sup>a</sup>	Média Y <sup>b</sup>	Diferença <sup>c</sup>
A-Marca metanol	97,3	86,9	-10,4
B-Marca hexano	92,8	90,9	-1,9
C-Volume hexano	93,6	90,6	-3,0
D-Marca CHCl <sub>3</sub>	90,7	93,5	2,8
E-Volume de CHCl <sub>3</sub>	89,7	94,6	4,9
F-Volume de H <sub>2</sub> O	92,7	91,6	1,1
G-Temperatura	89,3	94,9	5,6

<sup>a</sup>-Média das recuperações relativas a ensaios que possuem condição alternativa em comum.

<sup>b</sup>-Média dos resultados não incluídos na média X.

<sup>c</sup>-Diferença entre as médias X e Y.

Tabela 20. Individualização da influência das condições avaliadas para o ácido tenuazônico no teste de robustez.

Condições avaliadas	Média X <sup>a</sup>	Média Y <sup>b</sup>	Diferença <sup>c</sup>
A-Marca metanol	86,0	83,1	-2,9
B-Marca hexano	84,1	85,5	1,4
C-Volume hexano	83,6	85,9	2,3
D-Marca CHCl <sub>3</sub>	87,9	81,6	-6,3
E-Volume de CHCl <sub>3</sub>	85,8	83,8	-2,0
F-Volume de H <sub>2</sub> O	85,5	84,0	-1,5
G-Temperatura	85,2	84,3	-0,9

<sup>a</sup>-Média das recuperações relativas a ensaios que possuem condição alternativa em comum.

<sup>b</sup>-Média dos resultados não incluídos na média X.

<sup>c</sup>-Diferença entre as médias X e Y.

#### 4.5.2. Recuperação

As amostras de produto de tomate não contaminadas naturalmente, em duplicata, foram fortificadas com alíquotas de padrões de TeA e CpA em sete níveis diferentes, separadamente. Procedeu-se a extração, limpeza e quantificação de cada toxina pelo método descrito em 3.9.4.2.

A partir dos resultados obtidos para as recuperações de CpA e TeA foram calculadas as regressões lineares e as dispersões. A regressão linear para CpA (Figura 16) forneceu os seguintes dados: equação  $Y = 0,7631X - 0,2260$ ,  $r = 0,9827$  e desvio padrão 1,0720. A dispersão e os desvios individuais estão representados na Figura 17. Para o TeA, a equação da regressão linear (Figura 18) foi  $Y = 0,7226X + 0,7099$ , o coeficiente de correlação 0,9163 e o desvio padrão 1,6396. Na figura 19 temos a dispersão e o desvios individuais para recuperação do TeA. Pelos resultados apresentados, verifica-se que os coeficientes de correlação para as duas recuperações foram maiores que 0,90, sendo que a dispersão dos valores foi maior para a recuperação do TeA.

As análises de variância das recuperações de CpA e TeA demonstraram que não existiram diferenças significativas entre as médias do valores adicionados e dos valores encontrados ao nível de 5% de significância. Portanto podemos concluir que as regressões para as recuperações de CpA e TeA, nas concentrações usadas, são realmente lineares.

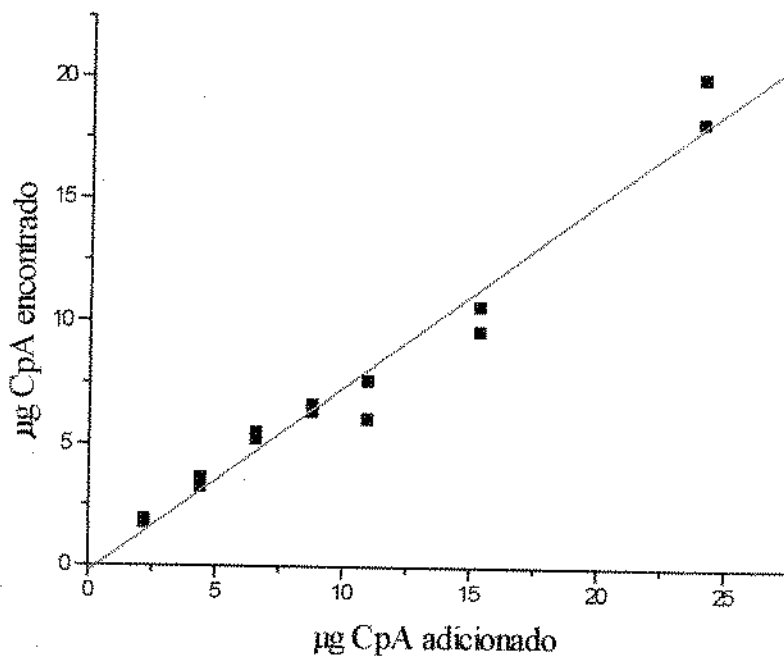


Figura 16. Regressão linear da recuperação do ácido ciclopiazônico.

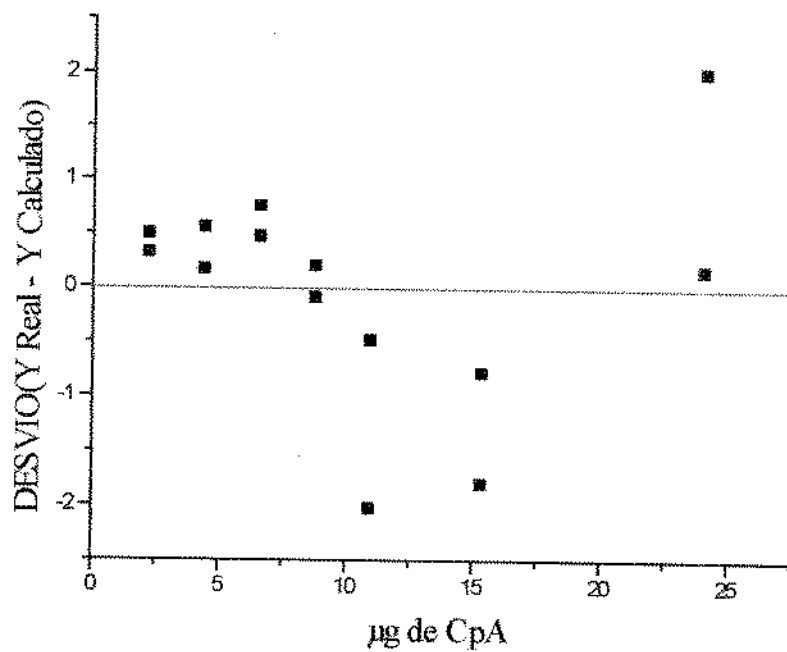


Figura 17. Dispersão e desvios individuais da recuperação de ácido ciclopiazônico.

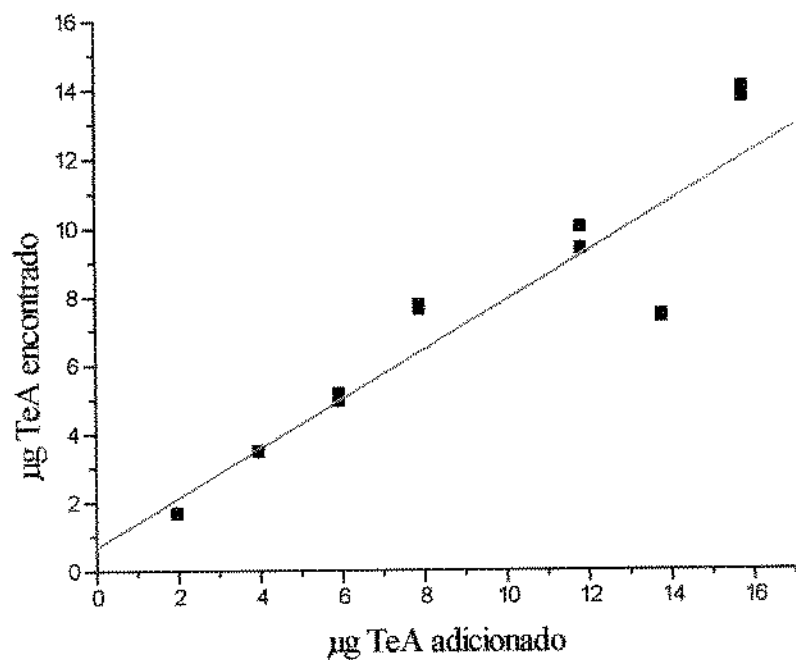


Figura 18. Regressão linear para a recuperação do ácido tenuazônico.

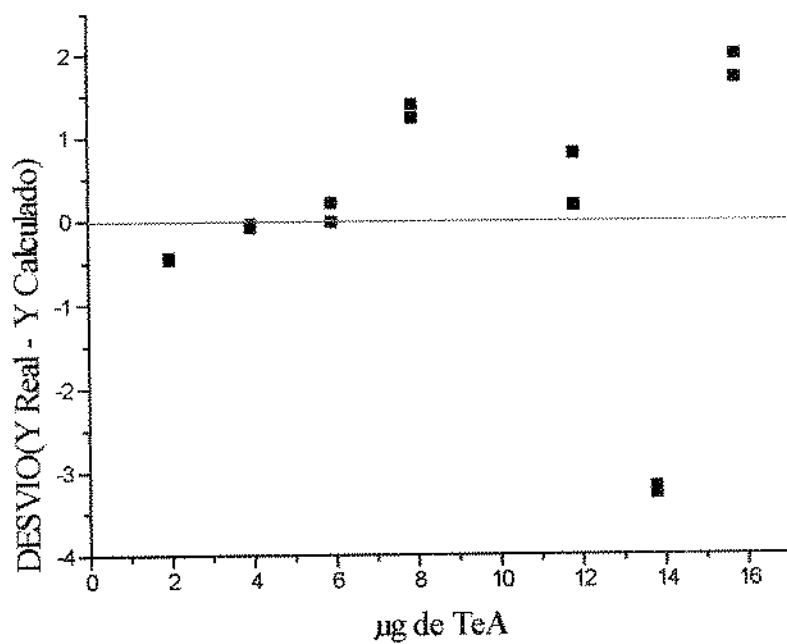


Figura 19. Dispersão e desvios individuais da recuperação de ácido tenuazônico.

Os valores de recuperação obtidos para TeA e CpA, empregando o método proposto, são apresentados na Tabela 21. O TeA apresentou recuperação média de 83,3% (54 a 97,9%) na faixa de concentração de 39,4-314 ng/mL. A faixa de recuperação obtida apresenta uma maior amplitude, do que a relatada por SCOTT & KANHERE (1980) que obtiveram recuperações que variaram de 67 a 94% para o TeA. A recuperação média de 83,3% (CV=1,8%) pode ser comparada à recuperação média de 83% (C.V=19%) registrada por STACK *et alii* (1985) para o TeA em amostras de ketchup, sendo que a recuperação do método aqui desenvolvido apresentou um coeficiente de variação dez vezes menor do que o relatado. Os dois trabalhos foram realizados com CLAE e detector ultravioleta/visível.

Uma recuperação média de 75,7% (62,8 a 84,7%) (CV=7,3%) foi obtida para o CpA na faixa de 43,8-481,4 ng/mL. Dentro do nosso conhecimento não existem métodos publicados para determinação de ácido ciclopiazônico em tomate ou seus produtos por CLAE. Para amostras de milho GOTO *et alii* (1987) obtiveram uma recuperação maior (82%) para CpA na concentração de 18 µg/g. Sendo que URANO *et alii* (1992) relataram recuperações na faixa de 72 a 84% para amostras de milho fortificado (50-500 ng/g) com desvio padrão relativo de 3,5%.



Tabela 21. Recuperação de ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico pelo método proposto.

Níveis	Ácido tenuazônico			Ácido ciclopiazônico		
	Concentração (ng/mL) <sup>a</sup>	Recuperação (%)	C.V. (%)	Concentração (ng/mL) <sup>a</sup>	Recuperação (%)	C.V. (%)
1	39,4	85,8	0,74	43,8	84,7	6,43
2	78,7	88,8	0,72	87,5	79,4	7,84
3	118,1	86,0	3,20	131,3	82,1	3,70
4	157,5	97,9	1,37	175,0	74,4	3,23
5	236,3	82,4	4,46	218,8	62,8	15,98
6	275,7	54,0	0,78	306,3	66,5	7,12
7	314,0	88,5	1,52	481,4	80,0	6,80

<sup>a</sup>-Média de duplicatas

C.V.= coeficiente de variação

### 4.5.3. Repetibilidade

A repetibilidade foi testada em amostras contaminadas artificialmente com vários níveis do TeA e do CpA, de acordo com o procedimento descrito em 3.9.4.2. O coeficiente de variação com relação às áreas registradas pelo detector referentes a injeções da mesma amostra ou padrão, apresentou uma faixa de 1,3% a 24,4% para o ácido tenuazônico e 3,5% a 48,9% para o ácido ciclopiazônico.

O cálculo da repetibilidade das amostras contaminadas artificialmente foi feito baseando-se nos resultados obtidos para a recuperação. As determinações de ácido tenuazônico apresentaram um coeficiente de variação médio de 1,8%, sendo que para o ácido ciclopiazônico o coeficiente foi de 7,3%. Podemos concluir que a repetibilidade depende do método e da substância em análise.

A precisão do método desenvolvido por HEISLER *et alii* (1980) para TeA foi avaliada utilizando-se uma série de 10 determinações. O valor obtido para o coeficiente de variação foi 5,4%. Pelos dados apresentados verifica-se que o nosso método apresentou melhor precisão para a determinação de TeA (CV = 1,8%).

Nas amostras naturalmente contaminadas (Tabela 22), o coeficiente de variação médio foi 13,4% e 19,2% para os ácidos tenuazônico e ciclopiazônico, respectivamente. O coeficiente de variação do ácido tenuazônico nas amostras contaminadas naturalmente foi em torno de 7,4 vezes maior que o encontrado no caso de contaminação artificial. Para o ácido ciclopiazônico, o coeficiente de variação foi da ordem de 2,6 vezes maior para as amostras contaminadas naturalmente que para as artificialmente contaminadas.

Tabela 22. Repetibilidade de amostras contaminadas naturalmente.

Amostra	Ácido tenuazônico		Ácido ciclopiazônico	
	Concentração (ng/g) <sup>a</sup>	Coefficiente de variação (%)	Concentração (ng/g) <sup>a</sup>	Coefficiente de variação (%)
polpa de tomate				
B1	n.d.	-	65,5	21,2
B3	n.d.	-	177,9	7,9
B4	102,7	31,9	n.d.	-
C1	45,0	6,6	n.d.	-
C2	55,8	5,5	n.d.	-
G4	n.d.	-	104,7	15,0
G5	n.d.	-	64,0	17,9
G6	87,5	26,8	134,0	23,9
G7	n.d.	-	107,5	14,2
J1	91,8	6,1	n.d.	-
J2	129,3	10,2	n.d.	-
L2	86,7	0,8	n.d.	-
purê de tomate				
D1	34,0	24,9	n.d.	-
G4	87,7	1,5	n.d.	-
I2	88,3	31,1	117,0	38,7
K4	36,0	1,6	36,5	15,1

<sup>a</sup>-Média de duplicatas

n.d.= não detectado

#### 4.5.4. Limite de detecção

Para o TeA e o CpA, os limites de detecção dos padrões puros, nas condições de trabalho descritas em 3.9.4.2. são 2,6 ng e 1,4 ng, respectivamente. Os limites de detecção para TeA e CpA foram determinados pela redução sucessiva da quantidade de toxina adicionada à amostra. Considerando o citado no item 4.4.4., os limites de detecção para TeA e CpA em produtos de tomate, são de 11,0 ng/g e 8,0 ng/g, respectivamente. Comparando o limite de detecção obtido para TeA com o valor encontrado na literatura verifica-se que o método desenvolvido é mais sensível. O limite de 11,0 ng/g é aproximadamente duas vezes mais sensível que o método desenvolvido por STACK *et alii* (1985) que apresentou valor de 25 ng/g para o TeA, em CLAE com detector ultravioleta/visível.

O limite de detecção de 8,0 ng/g obtido para CpA em produtos de tomate é aproximadamente dez vezes mais sensível que o método desenvolvido por GOTO *et alii* (1987) que apresentou valor de 100 ng/g para amostra de milho e seis vezes menor que o valor obtido de 50 ng/g por URANO *et alii* (1992) também para amostras de milho.

#### 4.5.5. Curva Padrão

As curvas de calibração, para CpA e TeA, foram elaboradas utilizando-se sete soluções metanólicas de concentrações variadas (Tabela 23). As curvas de calibração para CpA e TeA estão nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

A regressão linear foi calculada a partir dos valores obtidos. Determinou-se que  $y = 2,6021x - 0,0439$  ( $r=0,9894$ ) para CpA e  $y = 2,3331x + 1,9156$  ( $r=0,9987$ ) para TeA. O limite de confiança foi calculado para cada curva (WERNIMONT, 1985) e concluiu-se que as retas passavam pela origem ( $x=0$  e  $y=0$ ). As equações utilizadas para determinar as concentrações de CpA e TeA a partir das área relativas obtidas foram  $y = 2,6021x$  e  $y = 2,3331x$ , respectivamente.

As curvas de calibração usadas foram lineares nas concentrações de 0,36 a 10,74 ng/ $\mu$ L e 0,48 a 7,4 ng/ $\mu$ L para CpA e TeA, respectivamente. NORRED *et alii* (1987) utilizaram uma curva de calibração que a linearidade era de 0,016 a 15,6 ppm ( $r^2=0,997$ ) para CpA. Na análise de CpA em amostras de milho foi usada uma curva de calibração linear de 0,5 ng a 3  $\mu$ g (GOTO *et alii*, 1987)

Tabela 23. Faixa de linearidade e coeficiente de variação para os ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico.

Micotoxina	Faixa de linearidade (ng)	Coeficiente de variação médio (%)
Ácido ciclopiazônico	7-215	3,17
Ácido tenuazônico	10-148	3,95

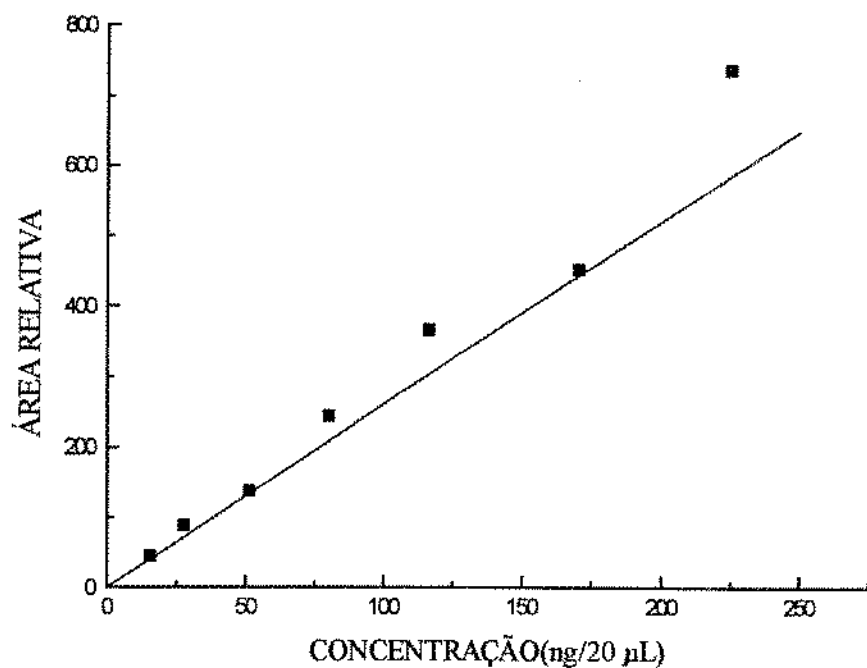


Figura 20. Curva padrão do ácido ciclopiazônico, CV = 3,2% (1,57-5,83%),  $Y=2,6021X$ .

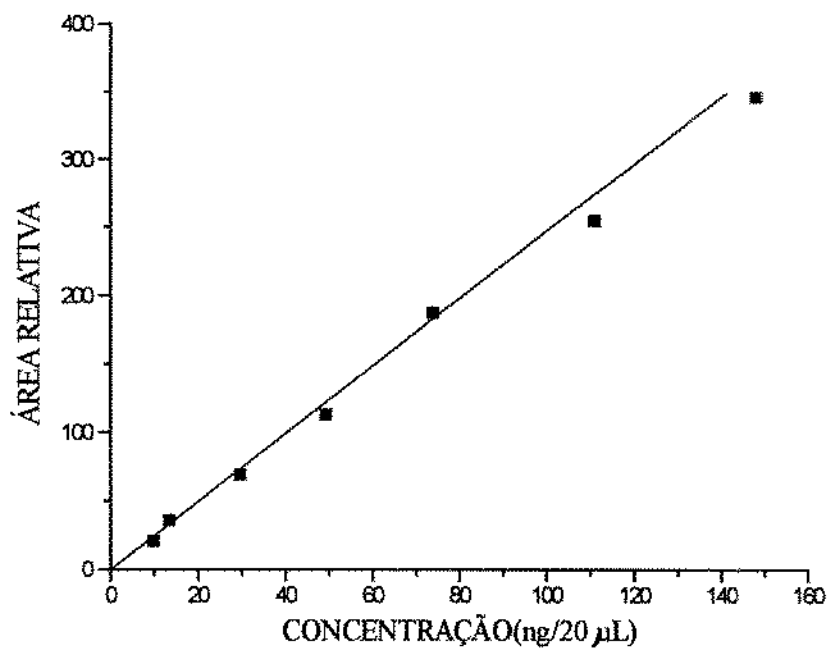


Figura 21. Curva padrão do ácido tenuazônico, CV = 3,9% (1,35-5,77%),  $Y=2,3331X$ .

#### 4.6. Levantamento da incidência de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico em produtos de tomate comercializados na região de Campinas, S.P.

As amostras de produtos de tomate foram submetidas inicialmente a uma triagem de acordo com os procedimentos descritos em 3.9.4.1 e 3.9.4.2. As amostras positivas foram analisadas em duplicatas e registrados os espectros dos picos correspondentes as micotoxinas, numa faixa de 200 a 500 nm. A confirmação de identidade das substâncias foi realizada pela comparação dos espectros dos picos das amostras com os espectros dos picos correspondentes aos padrões. As características do padrões no ultravioleta estão descritas no item 3.8.

Na Figura 22 estão representados os cromatogramas de uma amostra de produto de tomate não contaminada (A) e de uma amostra fortificada (B) com AME e AOH, respectivamente. Os espectros correspondentes a AME (Figura 23) e AOH (Figura 24) foram registrados a partir da amostra fortificada com as duas micotoxinas. Para a comparação foram utilizados os cromatogramas e espectros dos padrões de AME e AOH apresentados nas figuras 25(A e B) e 26(A e B), respectivamente. Observa-se no cromatograma correspondente à amostra fortificada (Figura 22-B), que o pico do AME está melhor separado dos picos interferentes do que o pico do AOH.

O perfil cromatográfico de uma amostra de produto de tomate não contaminada com CpA e TeA está na Figura 27(A). O cromatograma de uma amostra contaminada com CpA está na Figura 27(B). Na Figura 28 estão representados o cromatograma e o espectro do padrão de CpA. A confirmação de identidade do CpA foi realizada pela comparação dos espectros de absorvância obtidos pelo detector de espectrofotométrico com arranjo de diodos em amostras contaminadas (Figura 29-A), amostras fortificadas com o padrão (Figura 29-B) e o padrão puro (Figura 28-B).

Na análise do cromatograma de uma amostra contaminada com TeA (Figura 30), vê-se que o pico correspondente ao TeA não está bem separado dos picos dos interferentes. Na Figura 31 temos o cromatograma e o espectro do padrão de TeA. A comparação dos espectros do TeA na amostra contaminada (Figura 32-A) com o padrão puro (Figura 31-B) e na amostra fortificada (Figura 32-B) é indispensável para determinar-se a contaminação.

No levantamento da incidência das quatro micotoxinas houve amostras que estavam contaminadas simultaneamente com CpA e TeA. Na Figura 33 temos um cromatograma de uma amostra contaminada com estas duas toxinas. Neste caso, também foi feita a comparação dos espectros das amostras com os padrões.



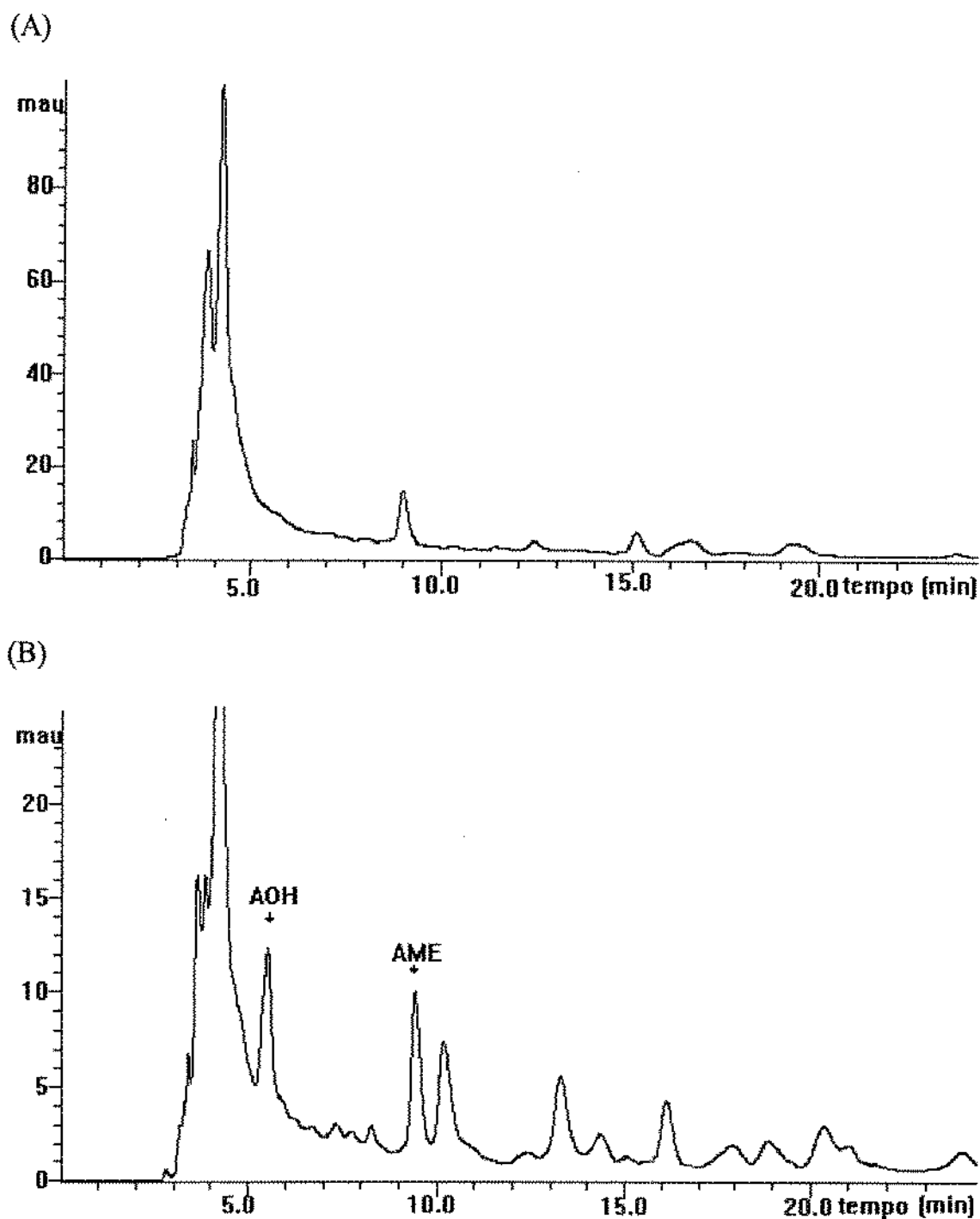


Figura 22. Perfil cromatográfico de uma amostra de produto de tomate não contaminada (A) e fortificada (B) com AME e AOH.

Condições: Coluna: Spherisorb ODS-2, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm

Fase móvel: Metanol/água (80:20, v/v) com 300 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/L}$

Vazão: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodos a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20  $\mu\text{L}$

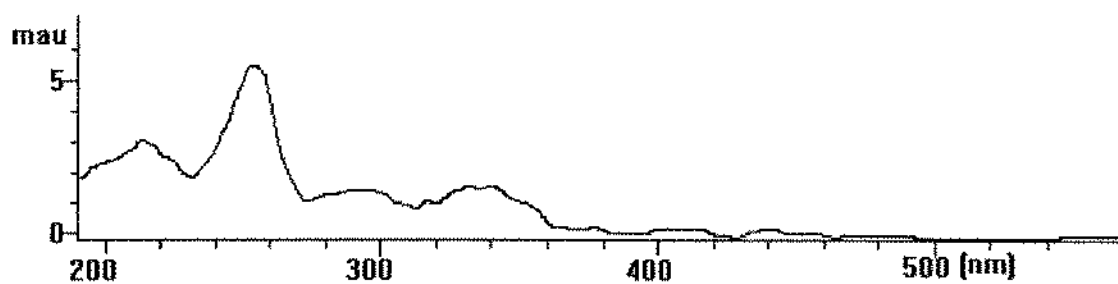


Figura 23. Espectro no ultravioleta de alternariol monometil éter obtido do cromatograma de produto de tomate fortificado com o padrão (Figura 22-B).

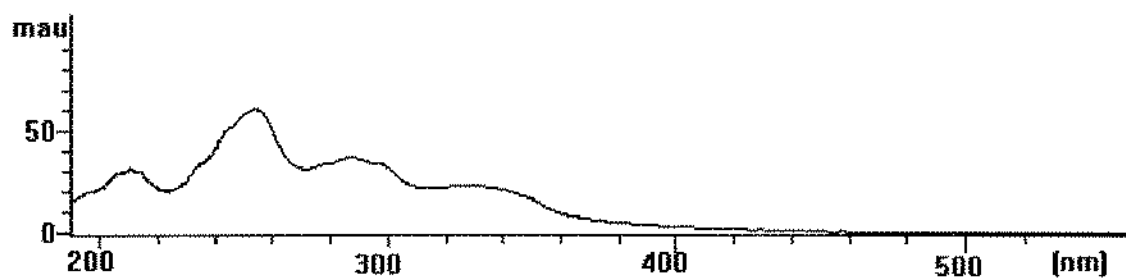
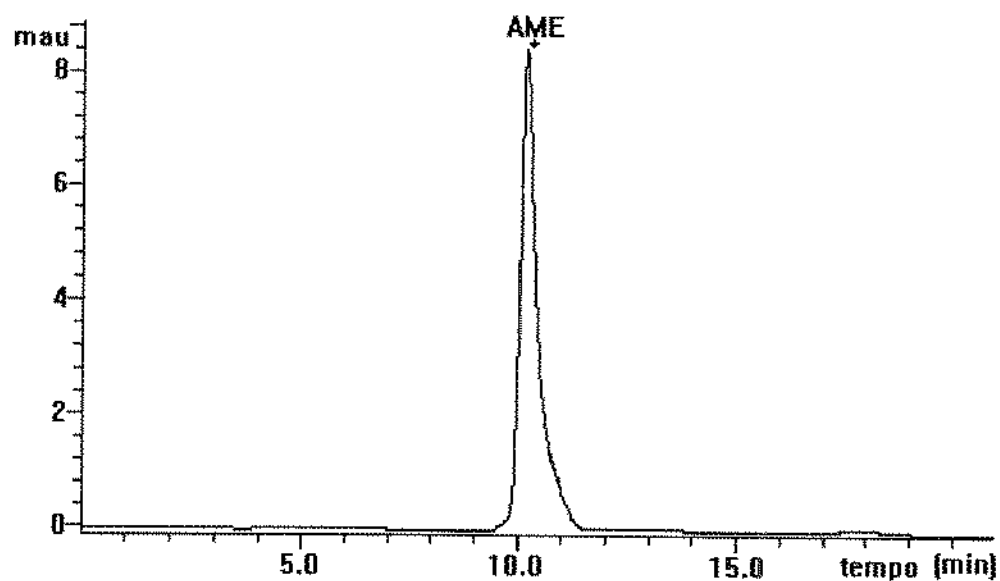


Figura 24. Espectro no ultravioleta de alternariol obtido do cromatograma de produto de tomate fortificado com o padrão (Figura 22-B).

(A)



(B)

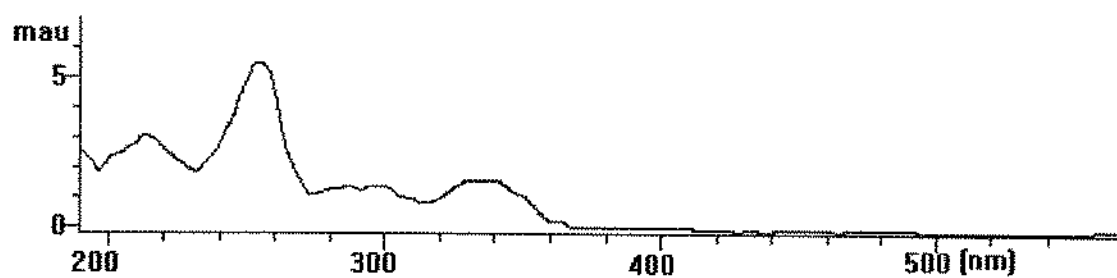


Figura 25. Perfil cromatográfico do padrão de alternariol monometil éter (A). Espectro no ultravioleta do padrão de alternariol monometil éter (B).

Condições: Coluna: Spherisorb ODS-2, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm

Fase móvel: Metanol/água (80:20, v/v) com 300 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/L}$

Vazão: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodos a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20  $\mu\text{L}$

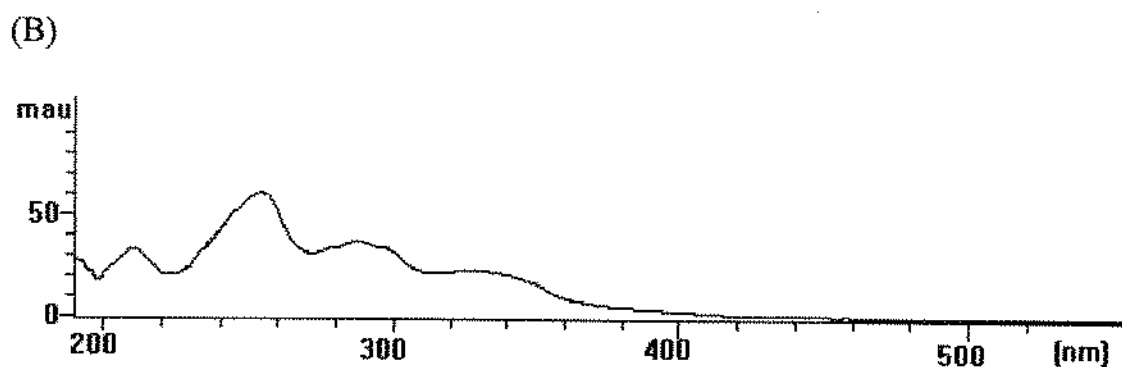
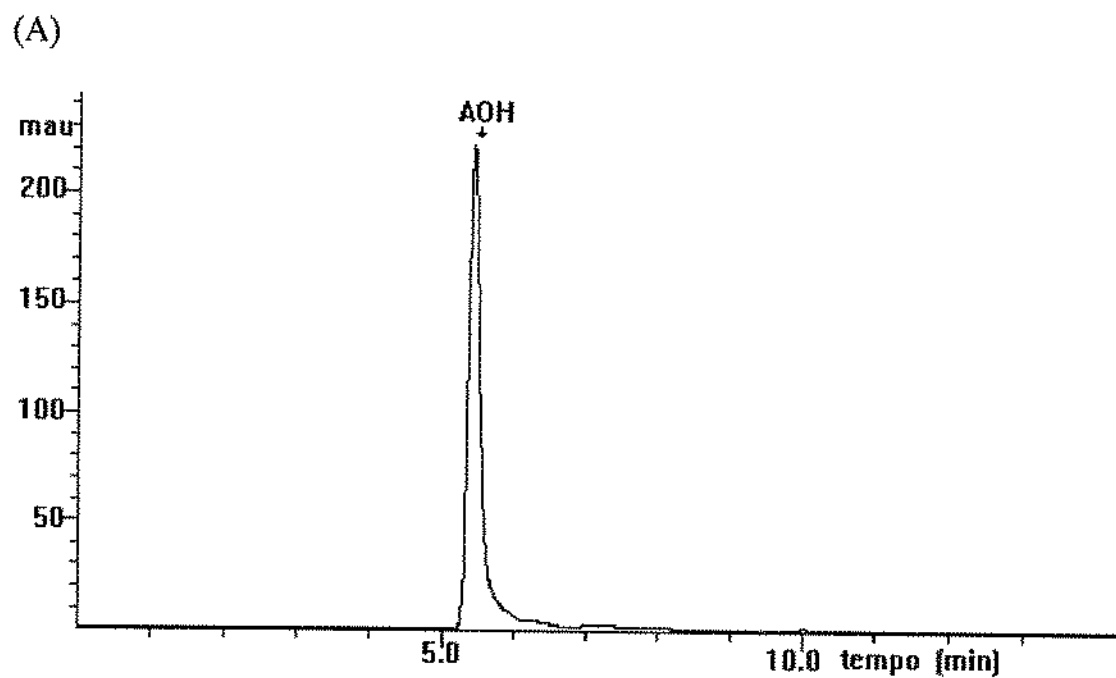


Figura 26. Perfil cromatográfico do padrão de alternariol (A). Espectro no ultravioleta do padrão de alternariol (B).

Condições: Coluna: Spherisorb ODS-2, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm

Fase móvel: Metanol/água (80:20, v/v) com 300 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/L}$

Vazão: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodos a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20  $\mu\text{L}$

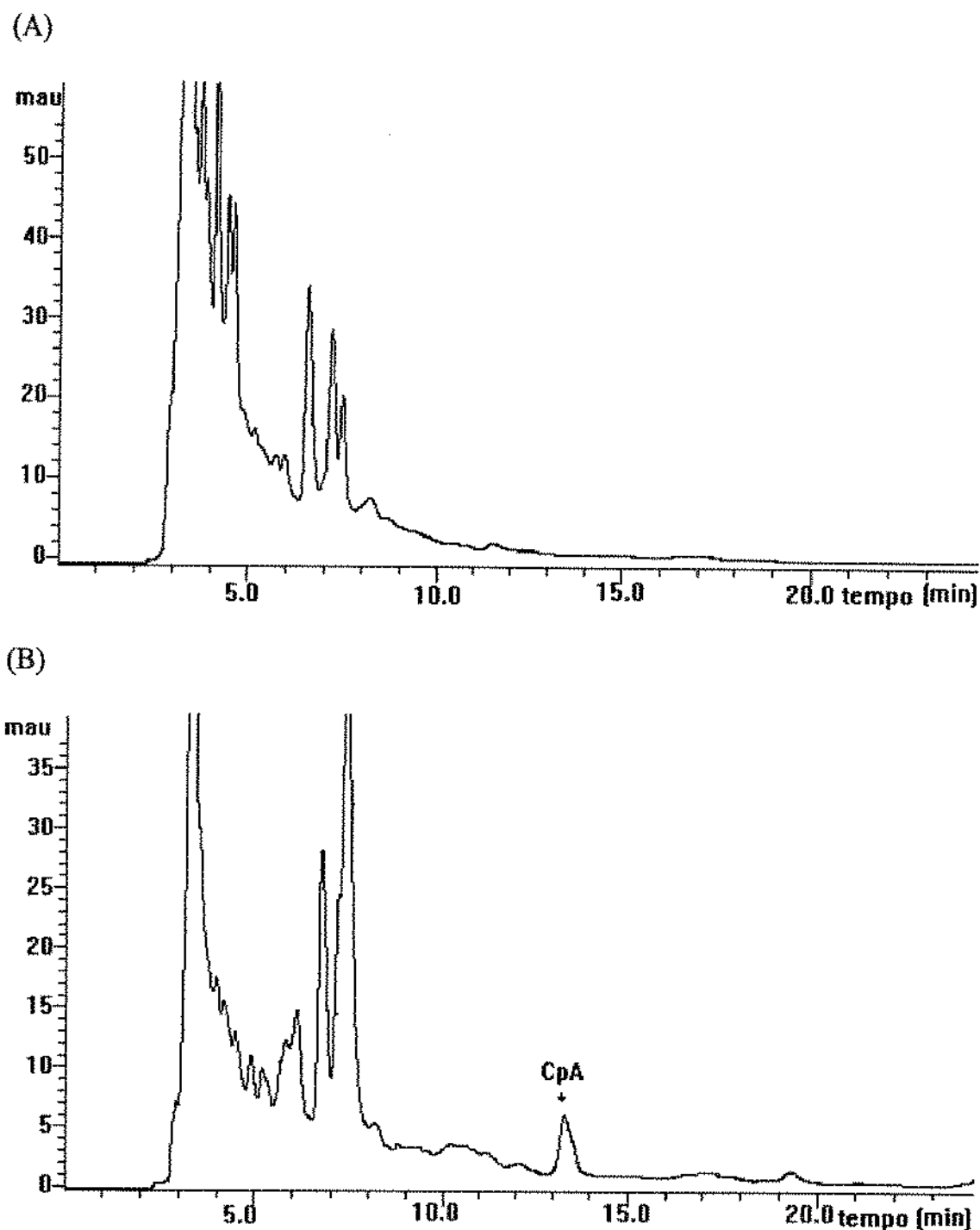


Figura 27. Perfil cromatográfico de uma amostra de produto de tomate não contaminada com ácido ciclopiazônico e ácido tenuazonico (A) e contaminada (B) com ácido ciclopiazônico.

Condições: Coluna: Spherisorb ODS-2, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm

Fase móvel: Metanol/água (90:10, v/v) com 300 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/L}$

Vazão: 0,8 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodos a 280 nm

Quantidade de amostra injetada: 20  $\mu\text{L}$

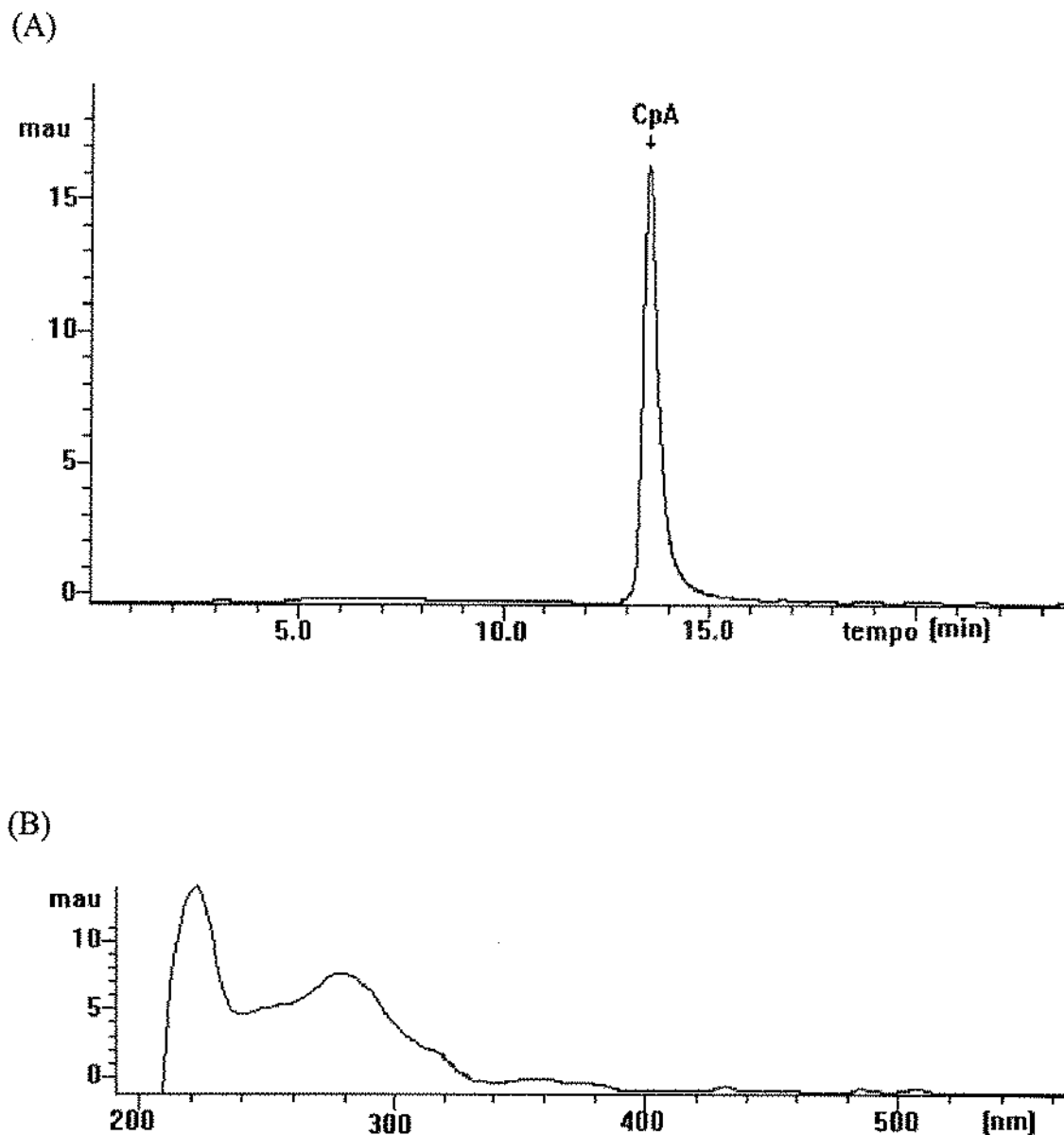


Figura 28. Perfil cromatográfico do padrão do ácido ciclopiazônico (A). Espectro no ultravioleta do padrão do ácido ciclopiazônico (B)

Condições: Coluna: Spherisorb ODS-2, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm

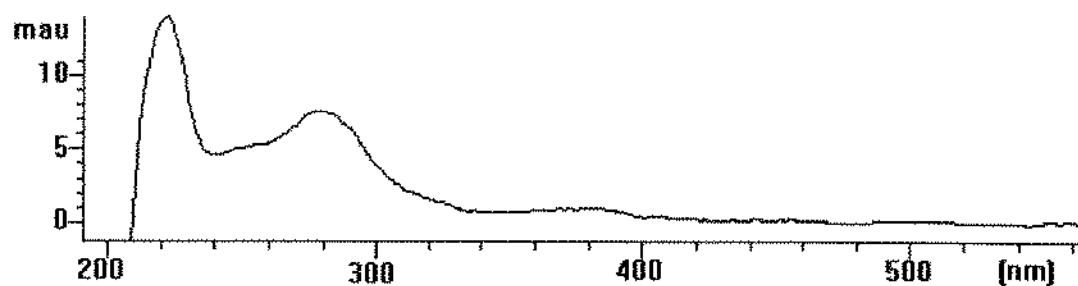
Fase móvel: Metanol/água (90:10, v/v) com 300 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/L}$

Vazão: 0,8 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodos a 280 nm

Quantidade de amostra injetada: 20  $\mu\text{L}$

(A)



(B)

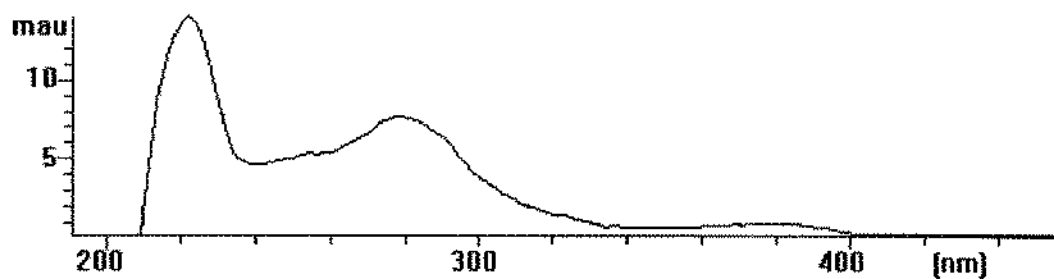


Figura 29. Espectro no ultravioleta do ácido ciclopiazônico obtido apartir do chromatograma (Figura 27-B) de produto de tomate contaminado (A). Espectro no ultravioleta do padrão do ácido ciclopiazônico de amostra fortificada (B).

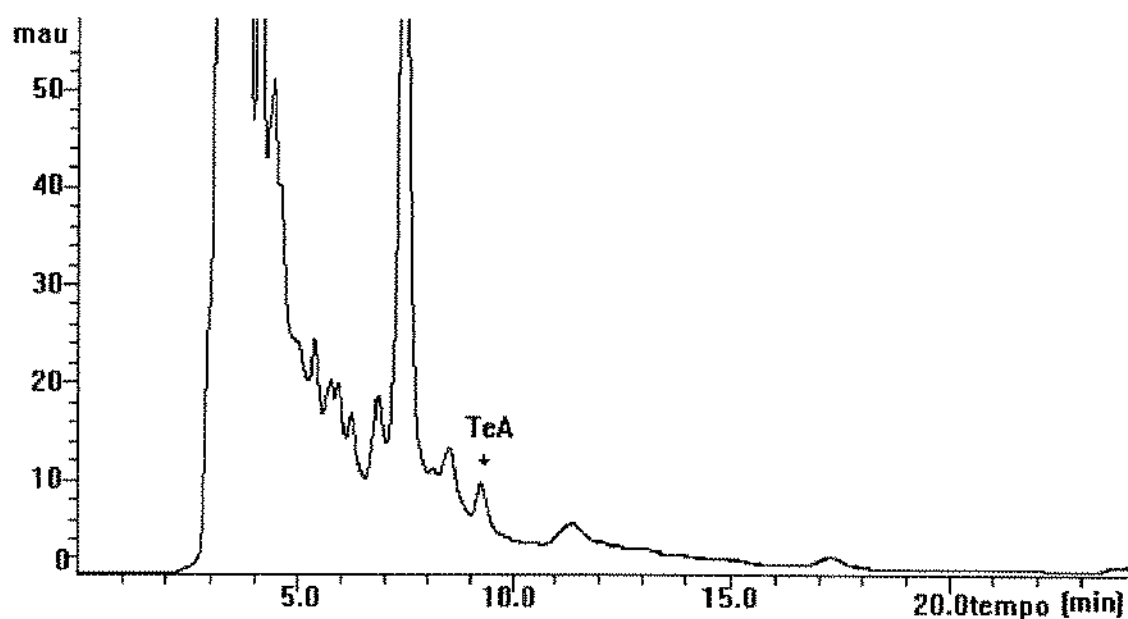


Figura 30. Perfil cromatográfico de uma amostra de produto de tomate contaminada com ácido tenuazônico.

Condições: Coluna: Spherisorb ODS-2, 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm

Fase móvel: Metanol/água (90:10, v/v) com 300 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/L}$

Vazão: 0,8 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodos a 280 nm

Quantidade de amostra injetada: 20  $\mu$ L



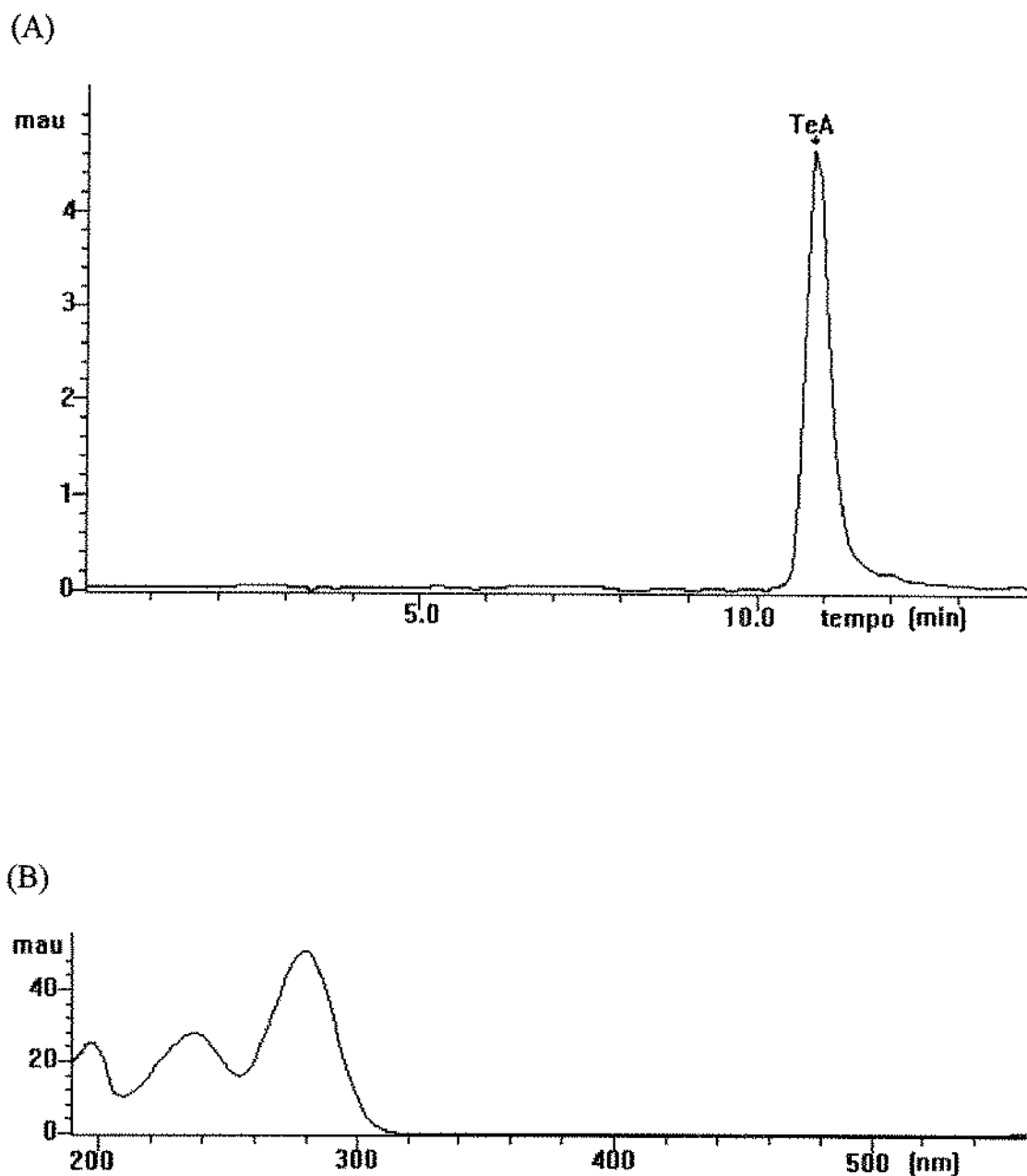
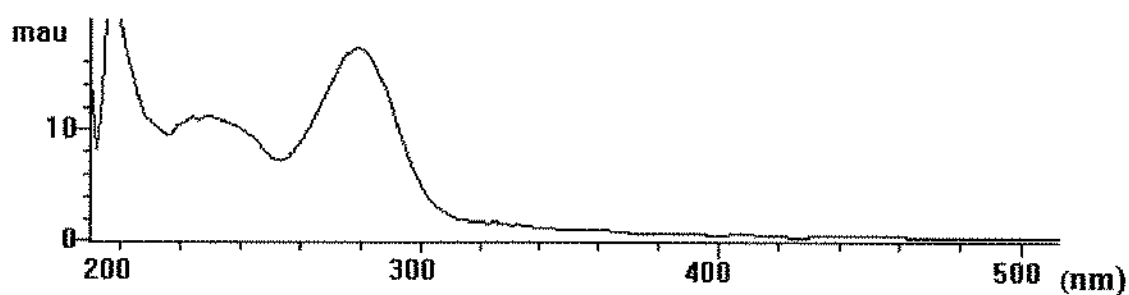


Figura 31. Perfil cromatográfico do padrão do ácido tenuazônico (A). Espectro no ultravioleta do padrão do ácido tenuazônico (B).

Condições: Coluna: Spherisorb ODS-2, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm  
Fase móvel: Metanol/água (90:10, v/v) com 300 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/L}$   
Vazão: 0,8 mL/min  
Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodos a 280 nm  
Quantidade de amostra injetada: 20  $\mu\text{L}$

(A)



(B)

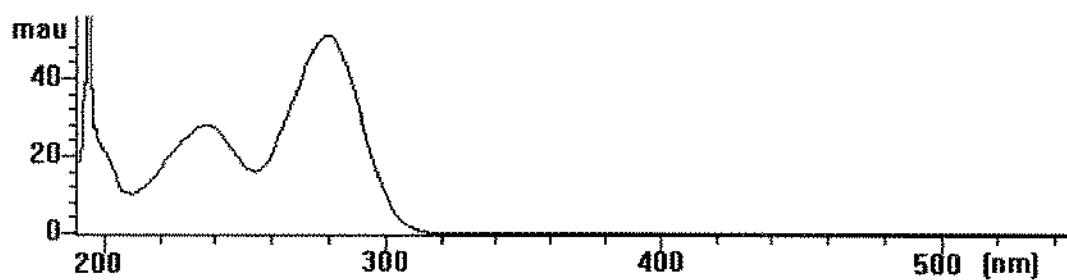


Figure 32. Espectro no ultravioleta do ácido tenuazônico obtido a partir do cromatograma (Figura 30) de produto de tomate contaminado (A). Espectro no ultravioleta do ácido tenuazônico de amostra fortificada (B).

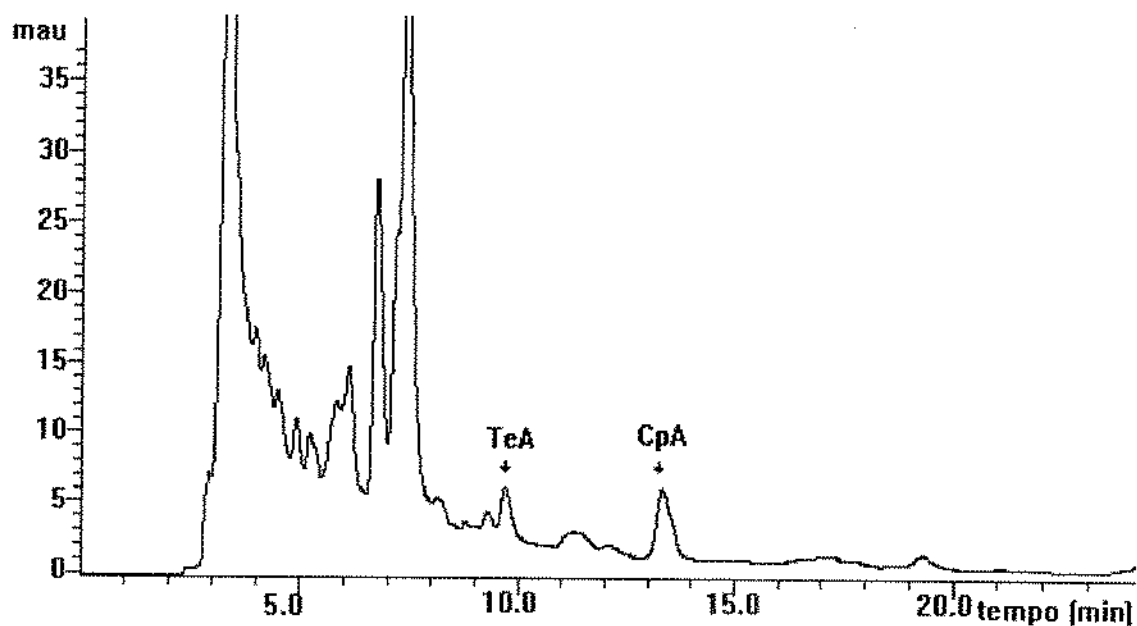


Figura 33. Perfil cromatográfico de uma amostra de produto de tomate contaminada com ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico

Condições: Coluna Spherisorb ODS-2, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm

Fase móvel: Metanol/água (90:10, v/v) com 300 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/L}$

Vazão: 0,8 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodos a 280 nm

Quantidade de amostra injetada: 20  $\mu\text{L}$

Ao todo, produtos pertencentes a 11 marcas foram examinados. As amostras de suco de tomate (11 amostras) mostraram-se livres de contaminação por AME, AOH, TeA e CpA. Das 22 amostras de polpa de tomate (Tabela 24), 6 amostras estavam contaminadas com CPA numa faixa de 64,0 a 177,9 ng/g e 7 amostras contaminadas com TEA numa faixa de 45,0 a 129,3 ng/g. Entre as amostras contaminadas, apenas uma amostra estava contaminada simultaneamente por CpA e TeA.

Nas amostras de purê de tomate (22 amostras) (Tabela 25), a contaminação por TeA e CpA foi detectada em 4 e 2 amostras, respectivamente. Entre elas duas amostras estavam contaminadas simultaneamente por TeA e CpA. As concentrações de TeA variaram de 34,0 a 88,3 ng/g e a de CpA de 36,5 a 117,0 ng/g.

As amostras de extrato de tomate (24 amostras) e tomates pelados (1 amostra) não apresentaram contaminação por nenhuma das quatro micotoxinas nos níveis detectados. Das 80 amostras de produtos de tomate analisadas, 10% (8) estavam contaminadas com CpA e 13,7% (11) com TeA, sendo que 3,8% (3) estavam contaminadas com TeA e CpA.

SCOTT & KANHERE (1980), analisando 8 amostras de tomate de 6 fabricantes diferentes, observaram a presença de ácido tenuazônico em todas e em concentrações variando de 0,1 a 0,01  $\mu\text{g/g}$ . STACK *et alii*. (1985) pesquisaram alternariol monometil éter e ácido tenuazônico em 142 amostras de tomates visivelmente emboloradas retiradas de linhas de produção de ketchup. Não encontraram alternariol monometil éter, mas encontraram ácido tenuazônico em 73 das amostras, em concentrações variando de 0,4 a 70  $\mu\text{g/g}$ . WITTKOWSKI *et alii* (1983) também não detectaram a presença de AME e AOH em produtos comerciais de tomate. MISLIVEC *et alii* (1987) analisaram 146 amostras de tomates frescos visivelmente mofados, sendo que 73 amostras foram positivas para TEA numa faixa de 0,4 a 69,7  $\mu\text{g/g}$ . Não existem relatos de contaminação de tomates e seus produtos com ácido ciclopiazônico que sejam do nosso conhecimento.

Tabela 24. Incidência de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico em amostras de polpa de tomate.

Marca	Amostra	Alternariol (ng/g)	Alternariol monometil éter (ng/g)	Ácido tenuazônico (ng/g)	Ácido ciclopiazônico (ng/g)
B	1	n.d.	n.d.	n.d.	65,5 ± 13,9
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	177,9 ± 14,1
	4	n.d.	n.d.	102,7 ± 32,7	n.d.
C	1	n.d.	n.d.	45,0 ± 3,0	n.d.
	2	n.d.	n.d.	55,8 ± 3,0	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	4	n.d.	n.d.	n.d.	104,7 ± 15,7
	5	n.d.	n.d.	n.d.	64,0 ± 11,5
	6	n.d.	n.d.	87,5 ± 23,5	134,0 ± 32,1
	7	n.d.	n.d.	n.d.	107,5 ± 15,3
J	1	n.d.	n.d.	91,8 ± 5,6	n.d.
	2	n.d.	n.d.	129,3 ± 13,1	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	86,7 ± 0,7	n.d.

n.d.= não detectado

Os resultados representam a média de duas determinações. O desvio padrão das duplicatas está indicado ao lado de cada valor médio.

Tabela 25. Incidência de alternariol, alternariol monometil éter, ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico em amostras de purê de tomate.

Marca	Amostra	Alternariol (ng/g)	Alternariol monometil éter (ng/g)	Ácido tenuazônico (ng/g)	Ácido ciclopiazônico (ng/g)
B	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D	1	n.d.	n.d.	34,0 ± 8,5	n.d.
G	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	4	n.d.	n.d.	87,7 ± 1,3	n.d.
	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
I	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	88,3 ± 27,4	117,0 ± 45,3
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
K	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	4	n.d.	n.d.	36,0 ± 0,6	36,5 ± 5,5
	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d= não detectado

Os resultados representam a média de duas determinações. O desvio padrão das duplicatas está indicado ao lado de cada valor médio.

## 5.0. CONCLUSÕES

1. Uma metodologia simples e rápida foi desenvolvida para determinação simultânea de alternariol e de alternariol monometil éter em produtos de tomate, por CLAE. A simplicidade e rapidez podem ser atribuídas à substituição de etapas trabalhosas e demoradas de limpeza do extrato como o uso de coluna de sílica, centrifugação e várias partições para diferentes solventes, por apenas uma clarificação com sulfato de amônia e partição para clorofórmio. As recuperações médias obtidas foram de 98,7% para AME e de 84,1% para AOH, para sete níveis de contaminação. A repetibilidade em amostras fortificadas exibiu coeficientes de variação de 0,8% e 5,4% para AME e AOH, respectivamente. Os limites de detecção do método para AME e AOH, nas amostras de produtos de tomate, são de 2,0 ng/g e 5,0 ng/g, respectivamente. Todos estes fatores fornecem indicadores da aplicabilidade do método.

2. Foi desenvolvida e avaliada uma metodologia para determinação de ácido ciclopiazônico e ácido tenuazônico em produtos de tomate, por CLAE. É uma metodologia de fácil exeqüibilidade, pois na limpeza do extrato temos apenas partições com hexano e com clorofórmio. A avaliação realizada mostrou recuperações médias de 75,7% e de 83,3% para os CpA e TeA, respectivamente, para sete níveis de contaminação. A repetibilidade em amostras fortificadas demonstrou coeficientes de variação que são de 7,3% para o CpA e de 1,8% para o TeA. Com amostras contaminadas naturalmente encontrou-se coeficientes de variação de 19,2% para o CpA e de 13,4% para o TeA. Os limites de detecção do método proposto foram de 8,0ng/g para o CpA e de 11,0 ng/g para o TeA. A simplicidade do método e os resultados obtidos na avaliação indicam que este método tem uma boa aplicabilidade.

3. As reações de derivação testadas para a confirmação de identidade de AME, AOH, CpA e TeA mostraram-se inadequadas nas condições testadas. Apesar da não obtenção de resultados promissores, maiores estudos deveriam ser realizados procurando-se reações de derivação química que forneçam a confirmação de identidade dos compostos. Isto facilitaria a utilização dos métodos por laboratórios que não possuem detector espectrofotométrico de arranjos de diodos.

4. Constatou-se por um simples teste de aquecimento dos padrões de AME, AOH, CpA e TeA a 90°C por 30 minutos, que Cpa e TeA formam compostos derivados, possivelmente isômeros já conhecidos pela literatura, quando submetidos ao tratamento térmico. A presença destes compostos deve ser considerada quando se trabalha com amostras de produtos de tomate que são submetidos a tratamentos térmicos, seja nas etapas de concentração ou pasteurização.

5. O levantamento realizado para determinar a incidência de AME, AOH, CpA e TeA em oitenta amostras de produtos de tomate comercializados na região de Campinas (extrato, polpa, purê, suco e tomates pelados) demonstrou que 10% estavam contaminadas com CpA, 13,7% com TeA, sendo que 3,8% estavam contaminadas com TeA e CpA simultaneamente. Na literarura existem relatos da presença do TeA em tomates, mas o AME e o AOH ainda não foram encontrados em produtos de tomate. À luz dos nossos conhecimentos esta foi a primeira vez que o CpA foi detectado em produtos de tomate.



## 6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 -ACS COMMITTEE ON ENVIROMENTAL IMPROVEMENT. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. Analytical Chemistry, v.52, n. 4, p.2242-2249, 1980.
- 2 -AN, Y.; ZHAO, T.; MIAO, J.; LIU, G.; ZHENG, Y.; XU, Y.; VAN ETEN, R.L. Isolation, identification, and mutagenicity of alternariol monomethyl ether. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 37, n. 5, p. 1341-1343, 1989.
- 3 -ANSARI, A.A. & SHRIVASTAVA, A.K. Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in sorghum and ragi from North Bihar, Índia. Food Additives and Contaminants, v. 7, n. 6, p. 815-820, 1990.
- 4 -AYRES, J.C.; KRAFT, A.A.; PIERCE, L.C. Delaying spoilage of tomatoes. Food Technology, v. 18, n. 8, p. 1210-1213, 1964.
- 5 -BANDLER, R.; BRICKEY, P.M.; CICHOWICZ, S.M.; GECAN,J.S.; MISLIVEC, P.B. Effects of processing equipment on howard mold and rot fragment counts of tomato catsup. Journal of Food Protection, v. 50, n.1, p. 28-37, 1987.
- 6 -BEVERIDGE, D.J.; HARRISON, D.M.; McGRATH, R.M. Liquid column chromatography using thin-layer chromatographic silica gel. Journal of Chromatography, v. 450, p. 443-447, 1988.
- 7 -BRADBURN, N.; COKER, R.D.; BLUNDEN, G. The aetiology of turkey "X" disease. Phytochemistry, v. 35, n. 3, p. 817, 1994.
- 8 -BRUCE, V.R.; STACK, M.E.; MISLIVEC, P.B. Incidence of toxic *Alternaria* species in small grains from the USA. Journal of Food Science, v. 49, n. 6, p. 1626-1627, 1984.

- 9 -BURROUGHS, R.; SEITZ, L.M.; SAUER, D.B.; MOHR, H.E. Effect of substrate on metabolite production by *Alternaria alternata*. Applied and Environmental Microbiology, v. 31, n. 5, p. 685-690, 1976.
- 10 -BUSBY Jr, W.F. & WOGAN, G.N. Aflatoxins. In: SHANK, R.C. Micotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks. Boca Raton, CRC Press, 1981. v.2, p. 1-27.
- 11 -CHANG-YEN, I. & BIDASE, K. Improved spectrophotometric determination of cyclopiazonic acid in poultry feed and corn. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v. 73, n. 2, p. 257-259, 1990.
- 12 -CHU, F.S. & BENNETT, S.C. High performance liquid chromatographic preparation of alternariol, alternariol methyl ether, and altenuene. Journal of the Association of the Official Analytical Chemists, v. 64, n. 4, p. 950-954, 1981.
- 13 -COOMBE, R.G.; JACOBS, J.J.; WATSON, T.R. Metabolite of some *Alternaria* species. The structures of altenusin and dehydroaltenusin. Australian Journal of Chemistry, v. 23, p. 2343- 2351, 1970.
- 14 -COLE, R.J. Etiology of Turkey "X" disease in retrospect: A case for the involvement of cyclopiazonic acid. Mycotoxin Research, v. 2, n. 1, p. 3-7, 1986.
- 15 -CULLEN, J.M.; WILSON, M.; HAGLER Jr, W.M.; ORT, J.F.; COLE, R.J. Histologic lesions in broiler chicks given cyclopiazonic acid orally. American Journal of Veterinary Research, v. 49, n. 5, p. 728-731, 1988.
- 16 -CVETNIC, Z. Cyclopiazonic acid and aflatoxin production by cultures of *Aspergillus flavus* isolated from dried beans and maize. Dee Nahrung, v. 38, n. 1, p. 21-25, 1994.

- 17 -DAVIS, N.D.; DIERNER, U.L.; MORGAN-JONES, G. Tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima* isolated from cotton. Applied and Environmental Microbiology, v. 34, n. 2, p. 155-157, 1977.
- 18 -DAVIS, V.M. & STACK, M.E. Evaluation of alternariol and alternariol methyl ether for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. Applied and Environmental Microbiology, v.10, n 10, p. 3901-3902, 1994.
- 19 -DORNER, J.W. Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus tamarii* Kita. Applied and Environment Microbiology, v. 46, n. 6, p. 1435-1437, 1983.
- 20 -DORNER, J.W.; COLE, R.J.; LOMAX, L.G.; GOSSER, H.S.; DIERNER, U.L. Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effects on broiler chickens. Applied and Environment Microbiology, v. 46, n. 3, p. 698-703, 1983.
- 21 -DORNER, J.W.; COLE, R.J.; ERLINGTON, D.J.; SUKSUPATH, S.; McDOWELL, G.H.; BRYDEN, W. Cyclopiazonic acid residues in milk and eggs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 42, n. 7, p. 1516-1518, 1994.
- 22 -DURACKOVÁ, Z.; BETINA, V.; NEMEC, P. Sistematic analyses of mycotoxins by thin-layer chromatography. Journal of Chromatography, v. 116, p. 141-154, 1976.
- 23 -ENGELHARDT, H. Practice of high performance liquid chromatography. Berlin: Springer-Verlag, 1986. 461p.
- 24 -FILTERBORG, O.; FRISVAD, J.C.; SVENDSEN, J.A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. Applied and Environment Microbiology, v. 45, n. 2, p. 581-585, 1983.

- 25 -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, v. 66, n. 1/2, p. 31-36, 1978.
- 26 -GEISEN, R.; GLENN, E.; LEISTNER, L. Two *Penicillium camemberti* mutants affected in the production of cyclopiazonic acid. Applied and Environment Microbiology, v. 56, n. 11, p. 3587-3590, 1990.
- 27 -GIAMBRONE, J.J.; DAVIS, N.D.; DIERNER, U.L. Effect of tenuazonic acid on young chickens. Poultry Science, v. 57, p. 1554-1558, 1978.
- 28 -GITTERMAN, C.O. Antitumor, cytotoxic, and antibacterial activities of tenuazonic acid and congeneric acids. Journal of Medicinal Chemistry, v. 8, n. 4, p. 483-486, 1965.
- 29 -GORST-ALLMAN, C.P. & STEYN, P.S. Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins. Journal of Chromatography, v. 175, p. 325-331, 1979.
- 30 -GOTO, T.; MATSUI, M.; KITSUWAT, T. Analysis of *Aspergillus* mycotoxins by gas chromatography using fused silica capillary column. Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology, v. 31, p. 43-47, 1990.
- 31 -GOTO, T.; SHINSHI, E.; TANAKA, K.; MANABE, M. Analysis of cyclopiazonic acid by normal phase high-performance liquid chromatography. Agricultural and Biological Chemistry, v. 51, n. 9, p.2581-2582, 1987.
- 32 -GRIFFIN, G.F. & CHU, F.S. Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol methyl ether, altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay. Applied and Environmental Microbiology, v. 46, n. 6, p. 1420-1422, 1983.

- 33 -GRUBER-SCHLEY, S. & THALMANN, A. Zum vorkommen von *Alternaria spp.* und deren toxine in getreid und mogliche zusammenhange mit leistungsminderungen land-wirtschaftlicher nutztiere. Landwirtschaftliche Forschung, v. 41, n. 1/2, p. 11-29, 1988.
- 34 -HAGGBLOM, P. & UNESTAM, T. Blue light inhibits mycotoxin production and increases total lipids and pigmentation in *Alternaria alternata*. Applied Environmental Microbiology, v. 38, n. 6, p. 1074-1077, 1979.
- 35 -HAHNAU, S. & WEILER, E.W. Determination of the mycotoxin cyclopiazonic acid by enzyme immunoassay. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 39, n. 10, p. 1887-1891, 1991.
- 36 -HAHNAU, S. & WEILER, E.W. Monoclonal antibodies for the enzyme immunoassay of the mycotoxin cyclopiazonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 41, n. 7, p. 1076-1080, 1993.
- 37 -HARRIS, S.A.; FISHER, L.V.; FOLKERS, K. The synthesis of tenuazonic acid and tetramic acids. Journal of Medicinal Chemistry, v. 8, n. 4, p. 478-482, 1965.
- 38 -HARVAN, D.J. & PERO, R.W. Gas chromatographic analyses of the *Alternaria* metabolite, tenuazonic acid. Journal of Chromatography, v. 101, p. 222-224, 1974
- 39 -HARWIG, J.; SCOTT, P.M.; STOLTZ, D.R.; BLANCHFIELD, B.J. Toxins of molds from decaying tomato fruit. Applied and Environmental Microbiology, v. 38, n. 2, p. 267-274, 1979.
- 40 -HEISLER, E.G.; SICILIANO, J.; STINSON, E.E.; OSMAN, S.F.; BILLS, D.D. High-performance liquid chromatographic determination of major mycotoxins produced by *Alternaria* molds. Journal of Chromatography, v. 194, p. 89-94, 1980.

- 41 -HENRY, A.R.; SCHMIT, J.A.; DIECKMAN, J.F. The analysis of steroids and derivatized steroids by high speed liquid chromatography. Journal of Chromatographic Science, v. 9, p. 513-520, 1971.
- 42 -HOLZAPFEL, C.W. The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling. Tetrahedron, v. 24, p. 2101-2119, 1968.
- 43 -HOLZAPFEL, C.W. & WILKINS, D.C. On the biosynthesis of cyclopiazonic acid. Phytochemistry, v. 10, p. 351-358, 1971
- 44 -HUANG, X. & CHU, F.S. Production and characterization of monoclonal and polyclonal antibodies against the mycotoxin cyclopiazonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 41, n. 2, p. 329-333, 1993.
- 45 -IUPAC-INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). Pure & Applied Chemistry, v. 65, n. 4, p. 819-872, 1993.
- 46 -IWASAKI, S.; MURO, H.; NOZOE, S.; OKUDA, S.; SATO, Z. Isolation of 3,4-dihydro-3,4,8-trihydroxy-1(2H)- naphthalenone and tenuazonic acid from *Pyricularia oryzae* Cavara. Tetrahedron Letters, v. 1, p. 13-16, 1972.
- 47 -KACZKA, E.A.; GITTERMAN, C.O.; DULANEY, E.L.; SMITH, M.C.; HENDLIN, D.; WOODRUFF, H.B.; FOLKERS, K. Discovery of inhibitory activity of tenuazonic acid for growth of human adenocarcinoma-1. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 14, p. 54-57, 1964.
- 48 -KINOSHITA, T.; RENBUTSU, Y.; KHAN, I.D.; KOHMOTO, K.; NISHIMURA, S. Distribution of tenuazonic acid production in the genus *Alternaria* and its pathological evaluation. Annals of the Phytopathological Society of Japan, v. 38, p. 397-404, 1972.

- 49 -LANSDEN, J.A. Liquid chromatographic analysis system for cyclopiazonic acid in peanuts. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v. 67, n. 4, p. 728-730, 1984.
- 50 -LANSDEN, J.A. Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin-layer chromatography. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v. 69, n. 6, p. 964-966, 1986.
- 51 -LANSDEN, J.A. & DAVIDSON, J.L. Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts. Applied and Environmental Microbiology, v. 45, n. 3, p. 766-769, 1983.
- 52 -LAWRENCE, J.F. & FREI, R.W. Chemical derivatization in liquid chromatography. New York, Elsevier, 1976. 212p. (Journal of Chromatography Library, v. 7)
- 53 -LE BARS, J. Cyclopiazonic acid bioproduction by *Penicillium camamberti* Thom. - effect of temperature on individual strains. Annales de Recherches Veterinaires, v. 10, n. 4, p. 601- 602, 1979a.
- 54 -LE BARS, J. Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camamberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. Applied and Environmental Microbiology, v. 38, n. 6, p. 1052-1055, 1979b.
- 55 -LEBRUN, M.N.; GAUDEMER, F.; BOUTAR, M.; NICOLAS, L.; GAUDEMER, A. Ion-pair, anion-exchange and ligand-exchange high performance liquid chromatography of tenuazonic acid and 3-acetyl 5-substituted pyrrolidine-2,4-diones. Journal of Chromatography, v. 464, p. 307-322, 1989.
- 56 -LEBRUN, M.N.; NICOLAS, L.; BOUTAR, M.; GAUDEMER, F.; RANUMENJANAHARY, S.; GAUDEMER, A. Relationships between the structure and the phytotoxicity of the fungal toxin tenuazonic acid. Phytochemistry, v. 27, n. 1, p. 77-84, 1988.

- 57 -LOGRIECO, A.; BOTTALICO, A.; VISCONTI, A.; VURRO, M. Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in some plant products. Microbiologie-Aliments-Nutrition, v. 6, n. 1, p. 13-17, 1988.
- 58 -LOMAX, L.G.; COLE, R.J.; DORNER, J.W. The toxicity of cyclopiazonic acid in weaned pigs. Veterinary Pathology, v. 21, n. 4, p. 418-424, 1984
- 59 -LUCAS, G.B.; PERO, R.W.; SNOW, J.P.; HARVAN, D. Analysis of tabacco for the *Alternaria* toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 19, n. 6, p. 1274-1275, 1971.
- 60 -LUK, K.C.; KOBBE, B.; TOWNSEND, J.M. Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* Link. Applied and Environmental Microbiology, v. 33, n. 1, p. 211-212, 1977.
- 61 -LUND, F.; FILTERBORG, O.; FRISVAD, J.C. Associated mycoflora of cheese. Food Microbiology, v. 12, p. 173-180, 1995.
- 62 -MAAS, M.R.; WOODY, M.A.; CHU, F.S. Production of alternariol and alternariol methyl ether by *Alternaria* spp. Journal of Food Safety, v. 3, p. 39-47, 1981.
- 63 -MADHYASTHA, M.S.; MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A.; BORSA, J. Optimization of yeast bioassay for trichothecene mycotoxins. Journal of Food Protection, v. 57, n. 6, p. 490-495, 1994.
- 64 -MAGAN, N.; CAYLEY, G.; LACEY, J. Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. Applied and Environmental Microbiology, v. 47, n. 5, p. 1113-1117, 1984.
- 65 -McCANN, J.; CHOI, E.; IAMASAKI; AMES, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* / microsome test: Assay of 300 chemicals. Proceeding of the National Academy of Science U.S.A., v. 72, n. 12, p. 39-47, 1981.



- 66 -MERONUCK, R.A.; STEELE, J.A.; MIROCHA, C.J.; CHRISTENSEN, C.M. Tenuazonic acid, a toxin produced by *Alternaria alternata*. Applied Microbiology, v. 23, p. 613-617, 1972.
- 67 -MIKAMI, Y.; NISHIJIMA, Y.; IIMURA, H.; SUZUKI, A.; TAKAMURA, S. Chemical studies on brown-spot disease of tobacco plants. Part I. Tenuazonic acid as a vivotoxin of *Alternaria longipes*. Agricultural and Biology Chemists, v. 35, n. 4, p. 611-618, 1971.
- 68 -MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V.R.; STACK, M.E.; BANDLER, R. Molds and tenuazonic acid in fresh tomatoes used for catsup production. Journal of Food Protection, v. 50, n. 1, p. 38-41, 1987.
- 69 -MOSS, M.O. Conditions and factors influencing mycotoxin formation in the field and during the storage of food. Chemistry and Industry, p. 533-536, 1984.
- 70 -MÜLLER, M. & LEPOM, P. Analysis of *Alternaria* mycotoxins in laboratory cultures. Zentrabl. Mikrobiologie, v. 147, n. 314, p. 197-206, 1992.
- 71 -NORRED, W.P.; COLE, R.J.; DORNER, J.W.; LANSDEN, J.A. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in poultry meat. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v. 70, n. 1, p. 121-123, 1987.
- 72 -NORRED, W.P.; MORRISSEY, R.E.; RILEY, R.T.; COLE, R.J.; DORNER, J.W. Distribution, excretion and skeletal muscle effects of the mycotoxin ( $^{14}\text{C}$ ) cyclopiazonic acid in rats. Food Chemistry and Toxicology, v. 23, n. 12, p. 1069-1076, 1985.
- 73 -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. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 36, n. 1, p. 113-116, 1988.

- 74 -NUEHRING, L.P.; ROWLAND, G.N.; HARRISON, L.R.; COLE, R.J.; DORNER, J.W. Cyclopiazonic acid mycotoxicosis in the dog. American Journal of Veterinary Research, v. 46, n. 8, p. 1670-1676, 1985.
- 75 -ORTH, R. Mycotoxins of *Aspergillus oryzae* strains for use in the food industry as starters and enzyme producing molds. Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, v. 31, n. 3/6, p. 617-624, 1977.
- 76 -ÖZEELICK, S. & ÖZEELICK, N. Interacting effects of time, temperature, pH and simple sugars on biomass and toxic metabolite production by three *Alternaria* spp. Mycopathologia, v. 109, p. 171-175, 1990.
- 77 -PALMISANO, F.; ZAMBONI, P.G.; VISCONTI, A.; BOTTALICO, A. Profiling of *Alternaria* mycotoxins in foodstuffs by high-performance liquid chromatography with diode-array ultraviolet detection. Journal of Chromatography, v. 465, n. 2, p. 305-316, 1989a.
- 78 -PALMISANO, F.; ZAMBONI, P.G.; VISCONTI, A.; BOTTAICO, A. Determination of *Alternaria* mycotoxins in foodstuffs by gradient elution liquid chromatography with electrochemical detection. Chromatografia, v. 27, n. 9/10, p. 425-430, 1989b
- 79 -PEARSON, R.C. & HALL, D.H. Factors affecting the occurrence and severity of blackmold of ripe tomato fruit caused by *Alternaria alternata*. Phytopathology, v. 65, n. 12, p. 1352-1359, 1975.
- 80 -PERO, R.W. & HARVAN, D. Simultaneous detection of metabolites from several toxigenic fungi. Journal of Chromatography, v. 80, p. 255-258, 1973.
- 81 -PERO, R.W.; HARVAN, D.; BLOIS, M.C. Isolation of the toxin, altenuisol, from the fungus, *Alternaria tenuis* Auct. Tetrahedron Letters, v. 12, p. 945-948, 1973a.

- 82 -PERO, R.W. & MAIN, C.E. Chlorosis of tobacco induced by alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria tenuis*. Phytopathology, v. 60, n. 12, p. 1570-1573, 1970.
- 83 -PERO, R.W.; OWENS, R.G.; DALE, S.W.; HARVAN, D. Isolation and identification of a new toxin, altenuene, from the fungus *Alternaria tenuis*. Biochemica et Biophysica Acta, v. 230, p. 170-179, 1971.
- 84 -PERO, R.W.; POSNER, H.; BLOIS, M.; HARVAN, D.; SPALDING. Toxicity of metabolites produced by the *Alternaria*. Environment Health Perspectives, p.87-94, Jun, 1973b.
- 85 -PETERSON, R.E.; SHANNON, G.M.; SHOTWELL, O.L. Purification of cyclopiazonic acid by liquid chromatography. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v. 72, n. 2, p. 332-335, 1989.
- 86 -PITT, J.I.; CRUICKSHANK, R.H.; LEISTNER, L. *Penicillium commune*, *Penicillium camemberti*, the origin of white cheese moulds, and the production of cyclopiazonic acid. Food Microbiology, v. 3, p. 363-371, 1986.
- 87 -POLLOCK, G.A.; DISABATINO, C.E.; HEIMSCH, R.C.; HILBELINK, D.R. The subchronic toxicity and teratogenicity of alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria solani*. Food Chemistry and Toxicology, v. 20, n. 6, p. 899-902, 1982.
- 88 -POOLE, C.F. & SCHUETTE, S.A. Contemporary practice of chromatography. Amsterdam, Elsevier 1984, 708p.
- 89 -POPKEN, A.M. & DOSE, K. Quantitative determination of cyclopiazonic acid in vegetable foods. Fresenius' Zeitschrift fuer Analytische Chemie, v. 316, p. 47-50, 1983.
- 90 -PURCHASE, I.F.H. The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 18, p. 114-123, 1971.

- 91 -RAO, B.L. & HUSAIN, A. Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculation*) causing "kodua poisoning" in man and its production by associated fungi. Mycopathologia, v. 89, n. 3, p. 177-180, 1985.
- 92 -RAO, B.L. & HUSAIN, A. A simple colorimetric method for screening cyclopiazonic acid in agricultural commodities. Mycopathologia, v. 97, n. 2, p. 89-92, 1987.
- 93 -RATHINAVELU, A. & SHANMUGASUNDARAM, E.R.B. Simple colorimetric estimation of cyclopiazonic acid in contaminated food and feed. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v. 67, n. 1, p. 38-40, 1984.
- 94 -REIB, J. *Alternaria* mycotoxins in grains and bread. Lebensmittel-Untersuchung und-forschung, v. 176, p. 36-39, 1983.
- 95 -ROBIGLIO, A.L. & LOPEZ, S.E. Mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from Red Delicious apples in Argentina. International Journal of Food Microbiology, v. 24, p. 413-417, 1995.
- 96 -ROSETT, T.; SANKHALA, R.H.; STICKINGS, C.E.; TAILOR, M.E.U.; THOMAS, R. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 103-Metabolites of *Alternaria tenuis* auct: culture filtrate products. Biochemical Journal, v. 67, p.390-400, 1957.
- 97 -SANCHIS, V.; SANCLEMENTE, A.; USALL, J.; VIÑAS, I. Incidence of mycotoxigenic *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus* in barley. Journal of Food Protection, v. 56, n. 3, p. 246-248, 1993.
- 98 -SAUER, D.B.; SEITZ, L.M.; BURROUCHS, R.; MOHR, H.E.; WEST, J.L.; MILLERET, R.J.; ANTHONY, H.D. Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 26, n. 6, p. 1380- 1383, 1978.

- 99 -SCHROEDER, H.W. & COLE, R.J. Natural occurrence of alternariols in discolored pecans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 25, n. 1, p. 204-206, 1977.
- 100-SCOTT, P.M. & KANHERE, S.R. Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid in tomato paste. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v. 63, n. 3, p. 612-621, 1980.
- 101-SCOTT, P.M. & STOLTZ, D.R. Mutagens produced by *Alternaria alternata*. Mutation Research, v. 78, n. 1, p. 33-40, 1980.
- 102-SEITZ, L.M. & MOHR, H.E. Analysis of *Alternaria* metabolites by high-pressure liquid chromatography. Analytical Biochemistry, v. 70, n. 1, p. 224-230, 1976.
- 103-SEITZ, L.M.; SAUER, D.B.; MOHR, H.E.; BURROUGHS, R. Wheathered grain sorghum: natural occurrence of alternariols and storability of the grain. Phytopathology, v. 65, n. 11, p. 1259- 1263, 1975a
- 104-SEITZ, L.M.; SAUER, D.B.; MOHR, H.E.; BURROUGHS, R.; PAUKSTELIS, J.V. Metabolites of *Alternaria* in grain sorghum. Compounds which could be mistaken for zearalenone and aflatoxin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 23, n. 1, p. 1-4, 1975b.
- 105-SMITH, E.E.; KUBENA, L.F.; BRAITHWAITE, C.E.; HARVEY, R.B.; PHILLIPS, T.D.; REINE, A.H. Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. Poultry Science, v. 71, p. 1136-1144, 1992.
- 106-SMITH, E.R.; FREDRICKSON, T.N.; HADIDIAN, Z. Toxic effects of the sodium and the N,N- dibenzylethylene-diamine salts of tenuazonic acid (NSC-525816 and NSC-82260). Cancer Chemotherapy Reports, v. 52, p. 579-585, 1968.

- 107-SOBERS, E.K. & DOUPNIK, Jr. B. Relationship of pathogenicity to tobacco leaves and toxicity to chicks of isolates of *Alternaria longipes*. Applied Microbiology, v. 23, n. 2, p. 313-315, 1972.
- 108-SÖDERHALL, K.; SVENSSON, E.; UNESTAM T. Light inhibits the production of alternariol and alternariol monomethyl ether in *Alternaria alternata*. Applied and Environmental Microbiology, v. 36, n. 5, p. 655-657, 1978.
- 109-SORENSEN, W.G.; TUCKER, J.D.; SIMPSON, J.P. Mutagenicity of the tetramic mycotoxin cyclopiazonic acid. Applied and Environmental Microbiology, v. 47, n. 6, p. 1355-1357, 1984.
- 110-STACK, M.E.; MISLIVEC, P.B.; ROACH, J.A.G.; POHLAND, A.E. Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid and alternariol methyl ether in tomatoes and tomato products. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v. 68, n. 4, p. 640-642, 1985.
- 111-STARRAT, A.N. & WHITE, G.A. Identification of some metabolites of *Alternaria cucumerina* (E & E) Ell. Phytochemistry, v. 7, p. 1883-1884, 1968.
- 112-STEYN, P.S. The separation and detection of several mycotoxins by thin-layer chromatography. Journal of Chromatography, v. 45, p. 473-475, 1969.
- 113-STEYN, P.S. & RABIE, C.J. Characterization of magnesium and calcium tenuazonate from *Phoma sorghina*. Phytochemistry, v. 15, p. 1977-1979, 1976.
- 114-STICKINGS, C.E. Metabolites of *Alternaria alternata* Auct: the structure of tenuazonic acid. Biochemical Journal, v. 72, p. 332-340, 1959.
- 115-STINSON, E.E.; BILLS, D.D.; OSMAN, S.F.; SICILIANO, J.; CEPONIS, M.J.; HEISLER, E.G. Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes and blueberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 28, n. 5, p. 960-963, 1980.

- 116-STINSON, E.E.; OSMAN, S.F.; HEISLER, E.G.; SICILIANO, J.; BILLS, D.D. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 29, n. 4, p. 790-792, 1981.
- 117-TRUCKSESS, M.W.; MISLIVEC, P.B.; YOUNG, K.; BRUCE, V.R.; PAGE, S.W. Cyclopiazonic acid production by cultures of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from dried beans, corn meal, macaroni and pecans. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v. 70, n. 1, p. 123-126, 1987.
- 118-UMETSU, N.; KAJI, J.; AYOMA, K.; TAMARI, K. Toxins in blast- diseased rice plants. Agricultural and Biological Chemistry, v. 38, n. 10, p. 1867-1874, 1974.
- 119-UMETSU, N.; KAJI, J.; TAMARI, K. Investigation on the toxin production by several blast fungus strains and isolation of tenuazonic acid as a novel toxin. Agricultural and Biological Chemistry, v. 36, n. 5, p. 859-866, 1972.
- 120-UMETSU, N.; KAJI, J.; TAMARI, K. Isolation of tenuazonic acid from blast-diseased rice plants. Agricultural and Biological Chemistry, v. 37, n. 2, p. 451-452; 1973.
- 121-URANO, T.; TRUCKSESS, M.W.; MATUSIK, J.; DORNER, J.W. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. Journal of the Association of Official Analytical Chemists International, v. 75, n. 2, p. 319-322, 1992.
- 122-VAN RESBURG, S.J. Subacute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid. Food Chemistry and Toxicology, v. 22, n. 12, p. 993-998, 1984.
- 123-VIÑAS, I.; BONET, J.; SANCHIS, V. Incidence and mycotoxin production by *Alternaria tenuis* in decayed apples. Letters in Applied Microbiology, v. 14, p. 284-287, 1992.

- 124-VIÑAS, I.; SIBILIA, A.; SALA, N.; SANCHIS, V.; VISCONTI, A. Mycotoxins and toxigenic species incidence in oilseed rape. Food Control, v. 4, n. 2, p. 79-82, 1993.
- 125-VISCONTI, A.; LOGRIECO, A.; BOTTALICO, A. Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in olives -their production and possible transfer into the oil. Food Additives and Contaminants, v. 3, n. 4, p. 323-330, 1986.
- 126-WEHNER, F.C.; THIEL, P.G.; RENSBURG, S.J.; VAN DEMASIUS, P.C. Mutagenicity to *Salmonella tiphimurium* of some *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins. Mutation Research, v. 58, p. 193-203, 1978.
- 127-WEI, C. & SWARTZ, D.D. Growth and production of mycotoxins by *Alternaria alternata* in synthetic, semi-synthetic and rice media. Journal of Food Protection, v. 48, n. 4, p. 306-311, 1985.
- 128-WERNIMONT, G.T. Use of statistics to develop and evaluate analytical methods. Arlington. Association of Official Analytical Chemists, 1985. 183p.
- 129-WIDIASTUTI, R.; MARYAN, R.; BLANEY, B.L.; SALINA; STOLTZ, D.R. Cyclopiazonic acid in combination with aflatoxins, zearalenone and ochratoxin A in Indonesian corn. Mycopathologia, v. 104, n. 3, p. 153-156, 1988.
- 130-WITTKOWSKI, M.; BALTES, W.; KRÖNERT, W.; WEBER, R. Bestimmung von *Alternaria*-Toxinen in Obst-und Gemüsurzeugnissen. Lebensmittel Untersuchung und-Forschung, v. 177, p. 447-453, 1983.