

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação
final da tese defendida por Lúcia
maria Valente Soares e aprovada pela
Comissão Julgadora em 16.10.87.
Campinas, 16 de outubro de 1987

Delia K. Amaya

Presidente da Banca

MICOTOXINAS: UM MÉTODO PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA
E INCIDÊNCIA EM ALIMENTOS COMERCIALIZADOS
NA REGIÃO DE CAMPINAS

LÚCIA MARIA VALENTE SOARES
Engenheira Química
Mestre em Ciências de Alimentos

15/87

Prof.^a Dr.^a DÉLIA RODRIGUEZ-AMAYA
Orientadora

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

CAMPINAS, SP, 1987

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A Francisco

ÍNDICE

	Página
Índice de Tabelas.....	iv
Índice de Figuras.....	vii
Resumo.....	viii
Summary.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	03
2.1. Natureza Química, Efeitos Tóxicos e Fatores que In- fluem na Produção.....	03
2.2. Incidência em Alimentos.....	18
2.3. Levantamentos Realizados no Brasil.....	25
2.4. Métodos Analíticos.....	28
2.4.1. Triagem.....	28
2.4.2. Cromatografia em Camada Delgada.....	32
2.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Ou- tros Métodos.....	49
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.1. Avaliação dos Métodos Existentes.....	56
3.2. Desenvolvimento de Novos Métodos.....	56
3.2.1. Preparo de Amostras Artificialmente Contamina- das.....	56
3.2.2. Teste de Solventes para Extração.....	57
3.2.3. Teste de Clarificantes para Limpeza de Extra- tos.....	57
3.2.4. Desenvolvimento da Minicoluna para Ocratoxina A	58
3.2.5. Método para Triagem e Quantificação de Ocrato- xina A.....	58

3.2.6. Método para Análise Simultânea de Ocratoxina A, Zearalenona, Esterigmatocistina e Aflatoxina B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	59
3.3. Quantificação.....	64
3.4. Confirmação.....	67
3.5. Levantamento: Amostragem e Preparo de Amostras.....	69
3.6. Comparação com o Método de Romer e o da A.O.A.C. Modificado.....	70
3.7. Testes Preliminares com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	70
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1. Aplicabilidade dos Métodos Existentes.....	71
4.2. Metodologia Analítica Desenvolvida.....	72
4.2.1. Sistema de Extração e Limpeza para Grãos Contaminados com Ocratoxina A.....	72
4.2.2. Minicoluna para Triagem da Ocratoxina A.....	80
4.2.3. Recuperação e Repetibilidade do Método Desenvolvido para Ocratoxina A.....	85
4.2.4. Recuperação e Repetibilidade do Método Desenvolvido para Zearalenona, Esterigmatocistina e Aflatoxina B ₁	85
4.3. Incidência de Ocratoxina A, Zearalenona, Esterigmatocistina e Aflatoxinas em Alimentos Comercializados na Região de Campinas, de Maio de 1985 a Junho de 1986..	93
4.4. Importância da Confirmação na Análise de Micotoxinas.	98
4.5. Comparação do Custo e Tempo de Análise do Método Proposto com os Métodos Preconizados pela A.O.A.C.....	101
4.6. Resultados Preliminares com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	101

5. CONCLUSÕES.....	106
6. BIBLIOGRAFIA.....	107
7. AGRADECIMENTOS.....	128

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1. Correlação entre ingestão diária de aflatoxinas e incidência de câncer hepático.....	16
2. Ocorrência de ocratoxina A em vários países em anos diferentes.....	20
3. Triagem por cromatografia em camada delgada.....	31
4. Sistemas de extração e limpeza em métodos que determinam ocratoxina A.....	33
5. Sistemas de extração e limpeza em métodos que determinam zearalenona e esterigmatocistina.....	34
6. Sistemas de extração e limpeza em métodos que determinam aflatoxina.....	35
7. Sistemas solventes para desenvolvimento em camada delgada de sílica gel. Métodos para determinação de uma única micotoxina.....	36
8. Recuperação e limite de detecção relatados em métodos que determinam uma única micotoxina.....	37
9. Sistemas de extração e limpeza em métodos para determinação simultânea de micotoxinas.....	43
10. Sistemas solventes para desenvolvimento em camada delgada de sílica gel. Métodos para determinação simultânea de micotoxinas.....	44
11. Solventes para cromatografia unidimensional em camada delgada para aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona....	45

12. Solventes para cromatografia bi-dimensional em camada delgada.....	46
13. Recuperação e limite de detecção relatados em métodos para análise múltipla de micotoxinas.....	47
14. Limites de detecção das técnicas RIA e ELISA.....	53
15. Solventes utilizados para desenvolvimento de micotoxinas em camada delgada de sílica gel 60G.....	68
16. Recuperação da ocratoxina A com diferentes solventes de extração.....	75
17. Recuperação da ocratoxina A com diferentes clarificantes	76
18. Avaliação do sulfato de cobre e sulfato de amônio como clarificantes.....	79
19. Limites de detecção em camada delgada para a ocratoxina A submetida a tratamentos diversos.....	81
20. Comportamento da ocratoxina A em várias minicolumnas desenvolvidas com diferentes solventes.....	83
21. Avaliação de solventes para desenvolvimento da minicolumna sílica gel/alumina com extratos de milho adicionados de ocratoxina A.....	84
22. Recuperação e repetibilidade com amostras artificialmente contaminadas com ocratoxina A.....	86
23. Recuperação e reprodutibilidade com amostras artificialmente contaminadas com aflatoxina B ₁	87

24. Recuperação e reprodutibilidade com amostras artificialmente contaminadas com esterigmatocistina.....	88
25. Recuperação e reprodutibilidade com amostras artificialmente contaminadas com zearalenona.....	89
26. Determinação de aflatoxinas ($\mu\text{g/kg}$), em arroz naturalmente contaminado, pelo método de Romer (1975) e pelo método proposto.....	91
27. Teores de zearalenona, em amostras de milho naturalmente contaminado, pelo método A.O.A.C. modificado e pelo método proposto.....	92
28. Incidência de micotoxinas em alimentos comercializados na região de Campinas (maio/85 - junho/86).....	95
29. Proporção de amostras contaminadas de acordo com o tipo de alimentos (Levantamento maio/85 - junho/86).....	96
30. Teores de micotoxinas nas amostras positivas.....	97
31. Amostras presuntivas positivas e sua confirmação.....	99
32. Tempo e custos envolvidos nos métodos da A.O.A.C., 1984.	102
33. Tempo e custos envolvidos no método proposto.....	103
34. Comparação de CLAE e CD para determinação de micotoxinas em alimentos.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Estruturas dos compostos do grupo das ocratoxinas.....	04
2. Estrutura da zearalenona e seus derivados.....	08
3. Estrutura da esterigmatocistina e seus derivados na natureza.....	11
4. Estruturas das substâncias do grupo de aflatoxinas.....	14
5. Minicolunas e seus solventes de desenvolvimento para triagem de micotoxinas.....	30
6. Extração e limpeza para triagem e quantificação de ocratoxina A.....	61
7. Minicoluna proposta para ocratoxina A.....	62
8. Quantificação da ocratoxina A.....	63
9. Extração e limpeza para análise simultânea de ocratoxina A, zearalenona, esterigmatocistina e aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	65
10. Triagem e quantificação simultâneas de ocratoxina A, zearalenona, esterigmatocistina e aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	66
11. Separação das micotoxinas produzida pelos diversos solventes de desenvolvimento.....	78

RESUMO

A situação dos alimentos ora consumidos no Brasil, com relação à contaminação de micotoxinas, é desconhecida. O maior empecilho para que uma avaliação seja realizada está no uso difundido de métodos de análise dispendiosos, demorados e de execução complexa que não podem ser executados pela maioria dos laboratórios brasileiros. Internacionalmente, o problema é também sentido e várias instituições têm chamado a atenção sobre a necessidade de métodos mais simples e mais acessíveis economicamente.

Um método rápido, simples e econômico para determinação simultânea de ocratoxina A, zearalenona, esterigmatocistina e aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ é proposto. Extração com metanol-KCl aquoso, seguida por uma limpeza por clarificação (sulfato de amônio e sulfato de cobre), partição para clorofórmio e quantificação por cromatografia em camada delgada, são empregados. O procedimento integral tem a duração de 2 1/2 horas e custa 7,5 vezes menos que a determinação das mesmas micotoxinas pelos métodos da A.O.A.C.. Um procedimento para triagem da ocratoxina A que emprega uma minicolumna de sílica gel/alumina é também apresentado. Determinações em triplicata para aflatoxina B₁, zearalenona e esterigmatocistina em 3 níveis diferentes e determinações com 5 repetições em 5 níveis diferentes para ocratoxina A, foram realizadas em amostras artificialmente contaminadas de fubá, feijão preto, arroz, farinha de mandioca e amendoim cru descascado. Recuperações e coeficientes de variação na faixa de 86-160% e 0-26% para ocratoxina A, 90-101% e 0-24% para aflatoxina B₁, 98-128% e 0-17% para esterigmatocistina e 96-107% e 0-17% para zearalenona, foram obtidos. A repetibilidade foi também verificada empregando arroz para aflatoxinas e milho para zearalenona, ambos

naturalmente contaminados. Paralelamente foram realizadas comparações com o método de Romer (1975) para aflatoxinas e uma modificação do método da A.O.A.C. para zearalenona.

Um levantamento foi conduzido envolvendo 296 amostras de milho e seus produtos, feijão, arroz e farinha de mandioca coletadas em supermercados e mercados na região de Campinas, durante o período de maio/85 - junho/86. A contaminação que abrangeu 4,7% das amostras foi considerada tolerável. Somente aflatoxinas (9 amostras, 20 a 52 $\mu\text{g/kg}$ B₁) e ocratoxina A (5 amostras, 32 a 160 $\mu\text{g/kg}$) foram encontradas.

SUMMARY

The present situation of foods consumed in Brazil is unknown as far as mycotoxin contamination is concerned. The roadblock to such an appraisal has been the current use of expensive, elaborate and time consuming methods of analysis which are inaccessible for most Brazilian laboratories. Internationally, the problem is also felt and a call for simpler and less expensive methods has been voiced by several entities from time to time.

A method for simultaneous determination of ochratoxin A, zearalenone, sterigmatocystin and aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ which is rapid, simple and inexpensive is proposed. A methanol-aqueous KCl extraction is used, followed by cleanup with clarifying agents (ammonium and cupric sulfate), partition into chloroform and quantitation by thin layer chromatography. The whole procedure takes 2 1/2 hours and costs about 7,5 times less than the same determinations accomplished by A.O.A.C. methods. A screening procedure for ochratoxin A is also presented which uses silica gel/alumina minicolumn developed for this purpose. Triplicate determinations for aflatoxin B₁, zearalenone and sterigmatocystin in 3 different levels and 5 replicate determinations for ochratoxin A in 5 different levels were conducted in artificially contaminated samples of yellow corn meal, dried black beans, polished rice, cassava flour and raw shelled peanuts. Recoveries and coefficients of variation ranged from 86-160% and 0-26% for ochratoxin A, 90-101% and 0-24% for aflatoxin B₁, 98-128% and 0-17% for sterigmatocystin and 96-107% and 0-17% for zearalenone. Repeatability was also verified using naturally contaminated samples for aflatoxins in rice and zearalenone in corn together with comparisons with the Romer (1975) method for aflatoxins and a modified A.O.A.C. method for zearalenone.

A survey was conducted of 296 samples of corn and its products, dried beans, polished and parboiled rice and cassava flour, purchased from retail markets in Campinas during the period of May'85/June'86. The contamination which comprised 4.7% of samples, was considered tolerable. Only aflatoxins (9 samples, 20 to 52 $\mu\text{g/kg}$ B₁) and ochratoxin A (5 samples, 32 to 160 $\mu\text{g/kg}$) were found.

1. INTRODUÇÃO

A situação dos alimentos consumidos no país, com relação à incidência e ao teor de micotoxinas é desconhecida. Os trabalhos realizados até agora, são em sua maior parte do estado de São Paulo e abordam principalmente aflatoxinas. Os dados obtidos até agora ainda são insuficientes para o próprio estado. Sendo o Brasil um país de clima quente e úmido, especialmente propício para o desenvolvimento deste tipo de problema, urge, através de levantamentos, estabelecer um quadro real da situação.

Levantamentos atendem a várias necessidades numa comunidade. Os dados gerados levam ao reconhecimento da existência e extensão de problemas, possibilitam reações adequadas e ainda permitem verificar se as medidas tomadas resultaram eficientes. Ao longo dos anos, mudanças nos teores e disseminação de contaminantes podem ser analisadas e as causas apontadas. Paralelamente, subsídios são fornecidos quanto a propriedade dos limites tolerados em produtos agrícolas e industrializados.

Levantamentos sobre a incidência de micotoxinas vêm sendo realizados em várias partes do mundo desde o fim da década de 70. Todo este acúmulo de dados vem indicando sistematicamente que a ocorrência de micotoxinas está correlacionada com a localização geográfica, a zona bioclimática e a sazonalidade. Torna-se aparente que os tipos de micotoxinas importantes para cada país diferem grandemente. Alguns destes países, como fruto de anos de extensivos levantamentos estão podendo agora concentrar seus esforços na monitoria de alguns poucos alimentos reconhecidos como potencialmente perigosos, com grande economia de recursos materiais e humanos.

Uma barreira para a realização deste tipo de trabalho no Brasil está na metodologia analítica correntemente difundida internacionalmente que é dispendiosa e de execução complexa e demorada. O número de laboratórios habilitados na realização de tais análises no país é insignificante para o seu tamanho. Por outro lado, muitos dos métodos deixam a desejar com relação a precisão e a sensibilidade. A própria Association of Official Analytical Chemists, entidade reconhecida mundialmente e dedicada à padronização de métodos analíticos, vem pedindo consistentemente, em seus relatórios anuais, o desenvolvimento de procedimentos mais simples e menos dispendiosos para micotoxinas.

O primeiro passo, portanto, na abordagem do problema vem a ser necessariamente o desenvolvimento ou adaptação de métodos analíticos para as condições dos laboratórios nacionais. Só então se torna possível encetar o exame sistemático de amostras dos alimentos entregues ao consumo da população.

Para este trabalho em particular, foram abordadas as micotoxinas ocratoxina A, zearalenona, esterigmatocistina e aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, por terem sido ao lado dos tricotecenos, as mais freqüentemente incluídas nos levantamentos realizados no exterior, assim como alvo do maior número de propostas de métodos para análise.

2. REVISÃO DA LITERATURA

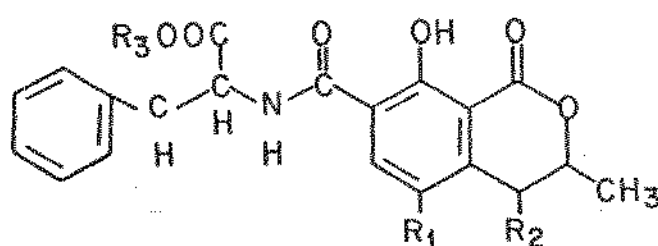
2.1. Natureza Química, Efeitos Tóxicos e Fatores que Influem na Produção

Ocratoxina A

As ocratoxinas são um grupo de compostos que possuem uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina (Figura 1). Foram descobertas na África do Sul, em 1965, por um grupo de cientistas que freqüentemente isolavam cepas de Aspergillus ochraceus, responsáveis por certos efeitos tóxicos em animais de laboratório, havendo subsequentemente identificado o metabólito responsável (Van Der Merwe et al., 1965).

A ocratoxina A tem sido considerada a mais potente do grupo. Recentemente, porém, testes com patinhos mostram que a ocratoxina C (éster etílico da ocratoxina A) e o éster metílico da ocratoxina A são igualmente tóxicos em contraste com os outros membros do grupo que são virtualmente inócuos (Stubblefield, 1979).

A ocratoxina A é primeiramente uma nefrotoxina. Seu alvo secundário é o fígado (Busby e Wogan, 1981a). Os efeitos principais são necrose do epitélio tubular renal e das células periportais hepáticas. Enterite freqüentemente acompanha o quadro (Wilson, 1978). Tem sido sugerido que a nefropatia endêmica dos Balcãs, possa estar associada com a freqüência e o nível elevado de ocratoxina A nos alimentos daquela região (Busby e Wogan, 1981a). Trata-se de uma endemia caracterizada por uma progressiva redução da função renal raras vezes acompanhada de retenção de sódio ou hipertensão (Wilson, 1978).



	R_1	R_2	R_3
Ocratoxina A	Cl	H	H
Ocratoxina B	H	H	H
Êster etílico da ocratoxina A (ocratoxina C)	Cl	H	CH_2CH_3
Êster metílico da ocratoxina A	Cl	H	CH_3
Êster etílico da ocratoxina B	H	H	CH_2CH_3
Êster metílico da ocratoxina B	H	H	CH_3
4-hidroxi-ocratoxina A	Cl	OH	H

Figura 1 - Estruturas dos compostos do grupo das ocratoxinas.

Em animais, a nefropatia suína foi amplamente estudada na Dinamarca onde representa um problema para os criadores. Nos distritos onde a incidência apresentou-se mais alta, 58% das amostras de rações continham ocratoxina A em níveis que iam de 69 a 27.500 µg/kg (Krogh e Hald, 1973). Níveis de 200 µg/kg em ração fornecida por 3-4 meses são suficientes para causar lesões nos rins de suínos. A ocratoxina A é fortemente tóxica para pássaros, mamíferos e peixes, com LD₅₀ na faixa de 5-30 mg/kg, quando administrada por via paraenteral (Busby e Wogan, 1981a). Por via oral, o LD₅₀ é de 20 mg/kg para ratos e as evidências apontam que o de bovinos esteja na mesma ordem (Ribelin, 1978). Para patinhos o LD₅₀ é de 3 mg/kg (Stubblefield, 1979). A citrinina e o ácido penicílico afetam a atividade da ocratoxina de maneira sinérgica (Sansing et al., 1976).

Resíduos de ocratoxina A foram encontrados em músculo, rins e gordura de porcos, assim como em músculo e ovos de frangos (máximo encontrado: 67 µg/kg) (Krogh, 1977). O órgão com o nível mais alto vem a ser o rim. Felizmente não há acumulação, ocorrendo eliminação dos resíduos em poucos dias após retirada da ração contaminada (Stoloff, 1982). Há passagem para o leite mas trata-se de uma excreção residual (Ribelin, 1978).

A ocratoxina A apresenta atividade fortemente teratogênica em cricetos, ratos e camundongos. Em fêmeas prenhes submetidas a uma única dose intraperitoneal de 5 a 20 mg de ocratoxina A por kg de peso corpóreo, do 7º ao 9º dia de gestação, 40 a 45% dos seus fetos apresentavam malformação do crânio, queixo, cauda e membros. A repetição da dose do 6º ao 15º dia de gestação produziu uma incidência de anomalias no coração e no esqueleto, diretamente proporcional ao nível da toxina. Dos fetos, 65% apresentavam retardo na formação do esqueleto, 75% ausência de vértebras e 100% redução do tamanho do atrium esquerdo (Hood et al., 1976) (Brown et al., 1976) (Hayes et al., 1974).

Quanto à carcinogenicidade existem poucos relatos sobre este tipo de efeito em relação a ocratoxina A. Num deles, 40 µg/kg na dieta de camundongos produziram adenomas renais e hepáticos em 30% dos espécimens em estudo (International Agency for Research on Cancer, 1971). Outro menciona a formação de hepatomas em trutas (Harwig, 1974). Não há indícios de mutagenicidade (Busby e Wogan, 1981a).

A ocratoxina A em solução apresenta uma estabilidade razoável em laboratório. Após 12 semanas, 45% são ainda detectados. Dados como este parecem indicar uma persistência de vários meses na natureza (Ribelin, 1978). Feijões contaminados com ocratoxina A apresentaram uma redução de 10% no nível da toxina após processamento térmico de 1 hora a 121°C e de 34% após 4 horas na mesma temperatura. Cereais mistos de aveia e arroz para café da manhã, quando autoclavados por 3 horas apresentaram uma diminuição de teor de ocratoxina A de 60%. O processo de torrefação de café é capaz de destruir toda a toxina presente em grãos de café assim como o de fabricação de cerveja o faz na cevada (Bullerman, 1979).

Os fungos relatados como produtores de ocratoxina A são: Aspergillus ochraceus, A. sulphureus, A. melleus, A. sclerotiorum, A. alliarius, A. ostianus, A. petrekii, Penicillium viridicatum, P. palitans, P. commune, P. cyclopium, P. variabile, P. purpureum (Ribelin, 1978).

Boa parte dos fungos produtores de ocratoxina A são encontrados associados a outros fungos capazes de produzir outras toxinas ou são eles mesmos dotados desta capacidade. A citrinina, o ácido penicílico, o ácido hidroaspergílico e um composto ainda não identificado produzido pelo P. viridicatum, são as toxinas mais encontradas em companhia da ocratoxina A (Ribelin, 1978).

Em trigo e cevada, onde a atividade de água (a_w) seja de 0,95, o P. viridicatum cresce em temperaturas de 0° a 31°C, exibin-

do produção de ocratoxina A em temperaturas de 12 a 24°C. A atividade de água ótima tanto para crescimento do fungo como produção da toxina é de 0,97. No entanto, o P. viridicatum cresce bem em (a_w) 0,90 a 0,93, com produção de altas concentrações de ocratoxina A (Northolt et al., 1979).

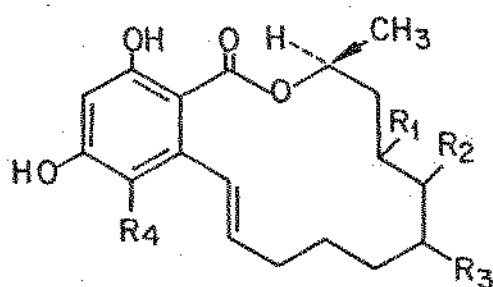
De uma maneira geral, os microrganismos produtores de ocratoxina A são higrofilos e são encontrados em cereais com teores de umidade acima de 16%. O pico de produção aparece entre 20 e 25°C, podendo ocorrer em temperaturas mais baixas com um possível limite mínimo a -2°C. Em condições ótimas, 7 a 14 dias são necessários para que um nível significativo da toxina seja atingido (Ribelin, 1978).

Em experiências com sementes viáveis de trigo e cevada assim como sementes inativadas pelo calor, inoculadas com cepas de P. viridicatum, ocorreu uma produção menor de ocratoxina A nas sementes viáveis. Nos dois casos a contagem revelou a mesma quantidade de inóculo (Harwig e Chen, 1974).

Zearalenona

Estritamente falando, zearalenona é uma substância estrogênica, derivada do ácido resorcílico (Figura 2). Foi descoberta em culturas de Giberella zeae, o estágio sexual ou perfeito do Fusarium roseum "graminearum" que havia sido isolado de milho embolorado implicado na etiologia de uma síndrome hiperestrogênica em suínos (Stob et al., 1962).

Em suínos, os sintomas de intoxicação apresentados são inflamação do útero, mamas, vulva (com prolapso vaginal ocasional) em fêmeas pré-púberes e atrofia testicular e inflamação das mamas em machos jovens, juntamente com a promoção de infertilidade em animais adultos (Busby e Wogan, 1981b). A zearalenona afeta suínos, ga-



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Zearalenona	H ₂	H ₂	=O	H
6',8' - Diidroxizearalenona	OH	H ₂	OH	H
8' - Hidroxizearalenona	OH	H ₂	=O	H
7' - Deidroxizearalenona	H	H	=O	H
5' - Formilzearalenona	H ₂	H ₂	=O	CHO
Zearalenol	H ₂	H ₂	OH	H

Figura 2 - Estrutura da zearalenona e seus derivados.

do leiteiro, galinhas, perus, camundongos, porquinhos da Índia, macacos e carneiros (Mirocha et al., 1977).

A zearalenona apresenta efeito teratogênico, produzindo um aumento, diretamente proporcional à dosagem, na incidência de anomalias no esqueleto de fetos de ratos. Foram observados costelas e esternos mal formados e ossificação retardada ou ausente em 37% dos fetos de 22 dias cujas mães haviam sido alimentadas com 10 mg da toxina por kg de peso corpóreo por dia, do 6º ao 15º dia de gestação (Stoloff, 1982).

A toxidez aguda da zearalenona é muito baixa, apresentando um LD₅₀ de 20 g/kg para camundongos (Mirocha et al., 1971).

A zearalenona juntamente com os tricotecenos (cerca de 40 substâncias tóxicas), a moniliformina e o butenolideno são produzidos por espécies de Fusarium. São relatadas como produtoras várias sub-espécies de F. roseum (graminearum, culmorum, equiseti, gibbosum e Avenaceum), assim como F. tricinctum (F. sporotrichoides), F. oxysporum, F. lateritium, e menos freqüentemente F. moniliforme (Busby e Wogan, 1981b).

Foi observado que suínos, ratos e faisões tem seu processo reprodutivo assim como órgãos genitais afetados por níveis de zearalenona da ordem de 2000 µg/kg, níveis esses que podem ser encontrados naturalmente em campos de milho. O mesmo não ocorre com galinhas e bovinos que podem tolerar níveis relativamente mais altos antes que efeitos sejam notados (Bennett, 1981).

Ao contrário de outros tipos de fungos, a produção de toxinas por Fusarium não ocorre nem na sua temperatura ótima de crescimento nem em temperaturas próximas. Fusarium cresce de 0º a 40ºC e sua temperatura ótima de desenvolvimento está entre 20 e 25ºC. Já as temperaturas ótimas para produção das toxinas são baixas, 12ºC para zearalenona e 8ºC para a toxina T-2. Conclui-se que Fusarium

produz toxinas quando sob efeito de um choque térmico. Em milho e trigo, uma umidade de 23% é necessária antes que o Fusarium possa desenvolver (Orth, 1981).

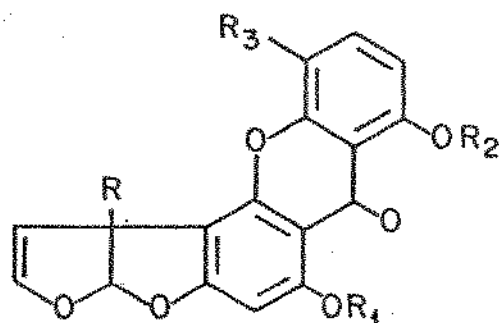
Esterigmatocistina

A esterigmatocistina pertence ao grupo das esterigmatocistinas que são caracterizadas pelo sistema de anel deidrofurobenzofurano acoplado a uma xantona (Figura 3). É a mais estudada e a mais tóxica do grupo.

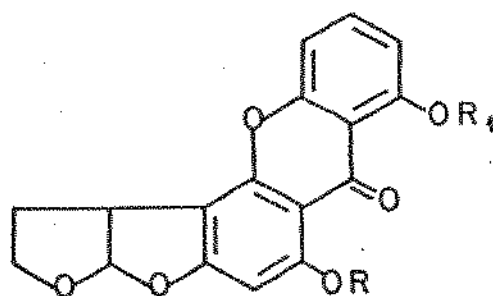
A esterigmatocistina e seus derivados O-metil são intermediários na síntese de aflatoxinas, conforme ficou demonstrado por reações enzimáticas e pela conversão de esterigmatocistina marcada com C^{14} para aflatoxina B_1 por A. parasiticus (Hsieh et al., 1973).

Trata-se de uma toxina hepática e renal capaz de produzir lesões em ratos e macacos semelhantes às provocadas pela aflatoxina B_1 . Entre seus efeitos estão a proliferação dos dutos biliares, pleomorfismo nuclear, assim como necrose renal hemorrágica e hepática (Busby e Wogan, 1981c).

Em macacos machos (Cercopithecus aethiops) a esterigmatocistina apresenta um LD_{50} de 32 mg/kg por injeção intraperitonal (van der Watt e Purchase, 1970). Para larvas de camarões de água salgada (Artemia salina), o LC_{50} é de 0,54 µg/ml (Harwig e Scott, 1971) e para larvas de peixe zebra, 0,24 µg/kg (Abedi e Scott, 1969). No entanto, para camundongos machos adultos Swiss-Webster, o LD_{50} oral é de 800 mg/kg e como consequência a esterigmatocistina é considerada relativamente não tóxica para esta espécie (Carlton e Szczech, 1978). Em contraste, para ratos Wistar o LD_{50} (teste de 10 dias) é de 166 mg/kg para machos e 120 mg/kg para fêmeas (Hamasaki e Hatsuda, 1977).



	R	R ₁	R ₂	R ₃
Esterigmatocistina	H	CH ₃	H	H
Aspertoxina	OH	CH ₃	CH ₃	H
O-Metilesterigmatocistina	H	CH ₃	CH ₃	H
5-Metoxisterigmatocistina	H	CH ₃	H	OCH ₃
6-Dimetilesterigmatocistina	H	H	H	H



	R	R ₁
Diidrosterigmatocistina	CH ₃	H
Diidro-O-metilesterigmatocistina	CH ₃	CH ₃
Diidrodimetilesterigmatocistina	H	H

Figura 3 - Estrutura da esterigmatocistina e seus derivados na natureza.

Observa-se que a toxidez aguda não é alta quando administração por via oral é utilizada. Por outro lado trata-se de uma substância hepatocarcinogênica. Em ratos, ela apresenta uma potência 1/10 da aflatoxina B₁ (Scott et al., 1985). Produz sarcomas nos locais de injeção (subcutânea) (Dickens et al., 1966) e neoplasias hepáticas em ratos quando administrada por sonda estomacal ou na dieta em concentrações de 10, 20 ou 100 µg/kg (Purchase e van der Watt, 1970). Camundongos alimentados com 5-10 µg/kg de ração por 2 anos mostraram 90% de incidência de tumores de fígado. Em macacos, a administração oral (20 mg/kg) a cada 14 dias por vários meses causou hepatite crônica e hiperplasia. Em primatas em geral, a toxina causa cirrose hepática. No momento, está em discussão a hipótese de que esteja vinculada à etiologia da doença crônica do fígado no homem africano (Cole e Cox, 1981).

A esterigmatocistina é um metabólito secundário de Aspergillus, incluindo A. rugulosus, A. versicolor e A. nidulans e de uma espécie não identificada de Bipolaris (Holzapfel et al., 1966). Tem sido relatada também a produção por um número de outros fungos incluindo Chaetomium sp. (C. thielarioedum, C. udagawae) (Udagawa et al., 1979a, b) (Sekita et al., 1973). Produção ocasional em baixos teores tem sido atribuída a certas cepas de A. chevalieri, A. ruber e A. amstelodami (Schroeder e Kelton, 1975).

Para linhagens de A. versicolor, há uma demora de 4 a 7 dias a 26°C para observar-se produção de esterigmatocistina. Produção máxima é obtida em 14 a 21 dias em arroz e milho. Já em pães a 20°C, em 10 dias chega-se à concentração máxima. A. versicolor desenvolve-se de 4 a 40°C, com uma temperatura ótima entre 20 - 30°C, podendo produzir a toxina de 15 a 32°C (Orth, 1973).

Em caldo Czapek, o pH 8 é considerado ótimo para crescimento de A. versicolor e para produção da toxina. Esta pode ocorrer ainda na faixa de pH de 3 a 8 (Orth, 1973). Em vários tipos de pão, o fungo cresce e produz toxina entre pH 4 e 7. O crescimento do fun

go é inibido quando o pH é superior a 9 (Reiss, 1976).

A atividade de água necessária para crescimento vegetativo do A. versicolor é de 0,75 e para esporulação é de 0,80. Em meios tais como pães e bolos, a produção de esterigmatocistina dá-se de 0,84 a 0,87 (Orth, 1973). Em amostras de trigo e milho em que A. versicolor foi encontrado, a umidade ultrapassava 14% (Christensen e Kaufmann, 1965). Presença de esterigmatocistina foi constatada em amostras de cevada estocada e com teores de umidade de 16 a 20% (Abranson et al., 1983).

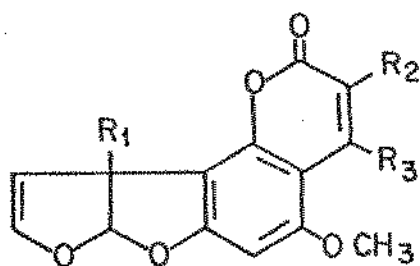
Aflatoxina

A descoberta das aflatoxinas deve-se à morte de milhares de peruzinhos, patinhos e pintinhos ocorrida em granjas inglesas em 1960 e 1961. O ponto em comum nas mortes veio a ser ração contendo amendoim contaminado com aflatoxina B₁.

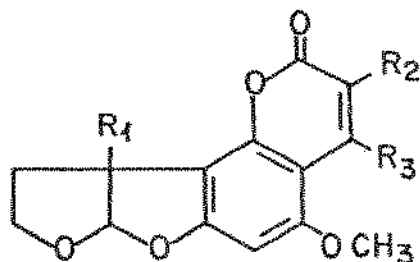
Quimicamente, as aflatoxinas são cumarinas substituídas ligadas a deidrofurano (Figura 4). Importantes em alimentos são as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. Em leite e derivados assume lugar de destaque a aflatoxina M₁, produto metabólico da aflatoxina B₁ ingerida pelo animal.

As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ são tóxicas para uma grande variedade de animais. O grau de intoxicação sofrida por indivíduos de uma mesma espécie animal depende da idade, sexo, fatores dietéticos e mesmo linhagem. O efeito tóxico das aflatoxinas diminui segundo a série B₁ > G₁ > B₂ > G₂ para roedores e patinhos (Wogan et al., 1971). Os sintomas observados são semelhantes aos da hepatite infecciosa (Wogan, 1973).

O fígado é o primeiro e mais importante alvo da toxina. Necrose e hemorragias são acompanhadas por proliferação dos dutos



	R_1	R_2	R_3
Aflatoxina B_1	H	$-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	
Aflatoxina G_1	H	$-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	
Aflatoxina M_1	OH	$-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	
Parasiticol	H	H	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$



	R_1	R_2	R_3
Aflatoxina B_2	H	$-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	
Aflatoxina G_2	H	$-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	
Aflatoxina M_2	OH	$-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	

Figura 4 - Estruturas das substâncias do grupo das aflatoxinas.

biliares e acúmulo de gorduras nas células hepáticas. Hemorragias em outras partes do organismo também podem ser observadas.

Dentre as espécies consideradas mais sensíveis ao efeito tóxico agudo das aflatoxinas, o coelho apresenta um LD_{50} de 0,3 mg/kg para aflatoxina B_1 . Já o camundongo, que é um exemplo de baixa sensibilidade aos efeitos tóxicos e de alta sensibilidade aos efeitos carcinogênicos, exibe um LD_{50} de 40 mg/kg (Wogan *et al.*, 1971). Para larvas de peixe zebra temos a série de LC_{50} de 0,52, 0,79, 1,0, 4,2 μ g/mL para B_1 , G_1 , B_2 e G_2 respectivamente (Abedi e Scott, 1969).

As aflatoxinas são carcinogênicas para muitas espécies incluindo roedores, primatas não humanos, pássaros e peixes (Busby e Wogan, 1981d). Trata-se do agente carcinogênico mais poderoso conhecido. Um milionésimo de grama causa câncer em ratos (Osborne, 1982). Apesar do fígado ser o órgão mais atingido, colonangiocarcinomas, tumores renais, carcinomas estomacais e adenocarcinomas do colon tem sido induzidos em camundongos, especialmente quando acompanhados de uma deficiência em vitamina A. A carcinogenicidade das aflatoxinas segue a série $B_1 > G_1 > B_2$. O possível efeito carcinogênico da aflatoxina G_2 não foi demonstrado (Busby e Wogan, 1981d).

A correlação entre câncer hepático em seres humanos e aflatoxinas tem sido demonstrada por estudos epidemiológicos tais como o da Tabela 1. Alto consumo de aflatoxina tem sido encontrado em áreas do mundo com alta incidência de câncer do fígado. Num mesmo ano foram relatados 9,8 casos por 100.000 habitantes na Nigéria, 19,2 na população bantu na África do Sul e 31 na população chinesa de Singapura. O maior índice já atingido de câncer no fígado foi o de Moçambique com 98,2 casualidades por 100.000 habitantes. Já em contraste, na Noruega, Holanda e Canadá, ocorre um caso por 100.000 habitantes por ano (Reiss, 1981).

A mutagenicidade das aflatoxinas tem sido demonstrada pe-

Tabela 1

Correlação entre ingestão diária de aflatoxina e incidência de câncer hepático (Reiss, 1981).

Região	ng ingestão diária por kg peso corpóreo (aflatoxina B ₁)	Incidência de câncer hepático por 100.000 habitantes por ano
Swazilândia		
Terras altas	5,1	2,2
Região central	8,9	4,0
Terras baixas	43,1	9,7
Quênia		
Terras altas	3,5	0,7
Região central	5,8	2,9
Terras baixas	10,0	4,2
Tailândia		
Songkhla	5,0	2,0
Ratburi	45,0	7,6
Singburi	73,0	14,0

la indução de mutações em genes em um grande número de sistemas eucarióticos e procarióticos. O efeito decresce na seguinte série: $B_1 > G_1 > B_2 > G_2$. A aflatoxina B_1 foi classificada como o segundo mais potente agente mutagênico, em bases moleculares, dentre 300 compostos mutagênicos testados na Salmonella typhimurium (Ames test). Anomalias cromossômicas foram também detectadas em cricetos (in vivo) e em células de ovários de cricetos (in vitro), assim como em culturas de células de pele humana (Busby e Wogan, 1981d).

Quanto à teratogenicidade, os dados existentes são limitados. A aflatoxina B_1 demonstrou ser um forte teratôgeno em cricetos onde encefalia e desorganização da medula podem ser induzidas pela toxina. Em galinhas, este efeito foi observado com o nascimento de indivíduos com membros deformados. Já em ratos e camundongos não foi obtida evidência neste sentido (Busby e Wogan, 1981d). Para algumas correntes científicas, Aspergillus flavus e Aspergillus parasiticus, são os únicos microrganismos reconhecidos como capazes de produzir as aflatoxinas. São fungos encontrados universalmente e capazes de desenvolver-se quando a umidade do substrato está relativamente baixa ($a_w = 0,85$ a $0,90$) e com temperaturas relativamente altas (30 a 40°C) (Stoloff, 1982). São capazes também de produzir toxina em qualquer alimento ou meio sintético que sustente seu crescimento (Busby e Wogan, 1981d). A. flavus tipicamente produz aflatoxinas B_1 e B_2 e tem sido encontrado predominando em sementes de algodão, nozes em geral e milho. A. parasiticus geralmente produz aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 , G_2 e M_1 e parece prevalecer em amendoim (Davis e Diener, 1983).

A. flavus e A. parasiticus crescem de 4 a 50°C . As temperaturas ótimas de crescimento estão entre 25 e 40°C , inclusive. São capazes de produzir aflatoxinas de 8 a 45°C , com um nível ótimo entre 20 e 30°C . A concentração máxima da toxina ocorre de 8 a 14 dias (Orth, 1981).

A. flavus é capaz de desenvolver-se a 30°C com 80-85% de umidade relativa, o que corresponde a um conteúdo de 9% para amendoim inteiro e 16% para amendoim moído desengordurado (Busby e Wogan, 1981b). Em milho, um teor de umidade de 17,5% e acima permite o crescimento de A. flavus mas só há produção de aflatoxina acima de 19 ou 20% em milho e 24-26% em arroz (Jarvis, 1971).

2.2. Incidência em Alimentos

Ocratoxina A

A ocratoxina A tem sido encontrada em milho, soja, trigo sarraceno, cevada, centeio, arroz, sorgo, feijão, amendoim, castanha do Pará, superfície de presuntos, pimentões vermelhos, pimenta do reino, café, vegetação em decomposição e no solo. Comumente, os níveis encontrados tem sido baixos, o maior relatado sendo 27,5 mg/kg (Ribelin, 1978).

Nos E.U.A., ocratoxina A foi encontrada em 18 de 127 amostras de cevada embolorada (Nesheim, 1971), enquanto que 130 amostras de marcas diferentes de cerveja não mostraram contaminação (Majerus e Woller, 1983). Milho aparentemente normal compreendendo 293 amostras foi examinado e 3 das amostras exibiam contaminação (Shotwell, 1971). Um levantamento com 848 amostras de trigo produziu 11 resultados positivos (Shotwell et al., 1976) enquanto outro com 102 amostras também de trigo deu resultados negativos (Shotwell et al., 1977).

No Canadá, no período de 1976-1978, 315 amostras de alimentos (incluindo milho, aveia, centeio, cevada, soja, amêndoas, arroz, malte, trigo sarraceno e linhaça) foram analisadas e somente 6 amostras continham ocratoxina A (3 a 8 µg/kg) (Williams, 1985). Em 1972, 18 amostras de cereais diversos dentre 29 examinadas, estavam

contaminadas (Scott et al., 1972). Estes levantamentos são parte de um programa nacional conduzido com o fito de determinar que micotoxinas constituem problema naquele país. Até o momento concluíram que no caso de alimentos produzidos internamente, a vigilância dos órgãos públicos deve ser concentrada em tricotecenos, zearalenona, ocratoxina A e ergot (Schiefer, 1985).

Na Dinamarca, inspeções regulares são realizadas em porcos abatidos. Quando a concentração de ocratoxina A excede 25 µg/kg no fígado do animal, a carcaça é condenada. Tal cuidado deve-se à frequência com que casos de nefropatia suína lá ocorrem. A correlação entre estes casos e a incidência de ocratoxina A nas rações já está bem estabelecida. Na Suécia, rins de porco que se apresentaram anormais por inspeção visual são analisados para ocratoxina A (Scott, 1985).

Na República Federal Alemã, 41 marcas de cervejas produzidas nacionalmente e 52 estrangeiras foram examinadas sem que a toxina fosse encontrada (Majerus e Woller, 1983). No milho importado por aquele país, 57 amostras provenientes da Zâmbia deram resultados negativos. Já no milho originário da Iugoslávia, de 191 amostras, 50 resultaram positivas, com teores de 0,045 a 5,1 mg/kg e uma média em 0,49 mg/kg. Duas amostras de milho francês também estavam contaminadas com ocratoxina A (Woller, 1981).

Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que a incidência de ocratoxina A é bastante variável de país para país e mesmo dentro de um mesmo país.

Zearalenona

Nos E.U.A., em 1973, um levantamento realizado pelo F.D.A. no milho colhido em todo o país, indicou que nos estados centrais,

Tabela 2

Ocorrência de ocratoxina A em vários países em anos diferentes (Sto
loff, 1982).

Material	Ano	País	Nº de amostras	% Amostras Contaminadas	Faixa (µg/kg)
Milho	1967	E.U.A.	283	0,4	130
Milho	1968-69	E.U.A.	293	1,0	83-166
Trigo	1970-73	E.U.A.	848	1,3	15-115
Sorgo	1975-76	E.U.A.	197	0	-
Cevada	1972	E.U.A.	159	14	10-29
Cevada maltada	1973	E.U.A.	138	0	-
Café cru	1972	E.U.A.	335	10	20-360
Rações	1972-77	Canadá	2022	0,1	-
Rações	1973-74	Inglaterra	131	1,5	traços
Milho	1973-74	França	924	1,9	15-200
Cevada e aveia	1971	Dinamarca	116	36	9-27500
Cevada e aveia	1972	Suécia	84	8	16-410
Cevada e aveia	1976	Suécia	189	4	5-11
Cevada (ração)	1966-77	Suécia	269	7	2-20
Milho (ração)	1975	Ioguslândia	191	26	45-5100
Cereais em geral	1972-76	Ioguslândia	768	13	14-140
Cereais para ração	1974	Polônia	302	5	50-200
Rações	1976	Polônia	234	5	10-50
Cereais em geral	1977	Índia	180	6	30-2000

onde a cultura de milho é realizada mais intensamente, a zearalenona aparecia em 10% das amostras enquanto que em outras áreas somente em 1% das amostras (Stoloff et al., 1976). Em 1975, 180 amostras de soja foram analisadas com resultados negativos. No mesmo ano, de 42 amostras de trigo 19 apresentaram-se positivas com teores de 0,36 a 11 mg/kg (Shotwell et al., 1977). Alguns casos de milho contaminado são relatados, todos anteriores a 1979 e onde a relação com hiperestrogenismo em suínos foi estabelecida. Ao todo foram oito amostras com teores de 0,1 a 32 mg/kg. Também da mesma época são conhecidos casos semelhantes envolvendo amostras de sorgo (12,0 e 5,6 mg/kg) e um de semente de gergelim (1,5 mg/kg) (Bennett e Shotwell, 1979). Em 1975-76, o Ministério da Agricultura Americano (U.S.D.A.) examinou 197 amostras de sorgo provenientes de 10 estados em que zearalenona, aflatoxina e ocratoxina A foram objeto de consideração. Zearalenona foi encontrada em 28% das amostras que continham de 200 a 6900 µg/kg. Aflatoxina só apareceu em 4 amostras e ocratoxina A em nenhuma (Shotwell et al., 1980). Em 1980 e 81, amostras de sorgo do estado da Georgia, correspondentes a 64 campos diferentes e tomadas antes da colheita, mostraram 31% de contaminação com níveis de 2 a 1468 µg/kg de zearalenona. Em contraste, em 1981, amostras colhidas de maneira similar em 15 áreas diferentes do delta do rio Mississippi, não apresentavam contaminação (Mc Millian et al., 1983).

No período de 1978-80, o Health Protection Branch, do Canadá, inspecionou 144 amostras de milho e seus produtos, tanto de origem doméstica como importada. Somente uma, dentre as 61 amostras importadas, continha zearalenona (200 µg/kg). Por outro lado, 23 das 81 amostras domésticas exibiram a toxina em teores de 13 a 475 µg/kg com a média em 96,7 µg/kg (Williams, 1985).

Trabalho muito interessante foi desenvolvido na Austrália em 1982. Foram analisadas 293 amostras provenientes de 111 fazendas

localizadas em oito distritos produtores de milho. Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A, esterigmatocistina, toxina T-2 e zearalenona foram pesquisadas. Somente zearalenona foi encontrada, estando presente em 85% das amostras, com uma concentração média de 0,17±0,225 mg/kg. Quatro amostras excederam 1 mg/kg. As concentrações mais altas apareceram nos distritos onde o índice pluviométrico foi mais elevado durante o período de crescimento do milho (Blaney, et al., 1984).

O milho tem sido o cereal mais freqüentemente implicado em casos de hiperestrogenismo em animais. Relatos envolvendo milho tem surgido com freqüência do Canadá, Inglaterra, França, E.U.A., Rússia e Iugoslávia. O mesmo ocorre em países africanos como Zâmbia, Swazilândia e Lesotho (Bennett e Strotwell, 1979).

Um aspecto importante da contaminação com zearalenona está na indicação que a presença de uma toxina de Fusarium, geralmente implica na existência de outras (Bennett e Shotwell, 1979).

Esterigmatocistina

Não existem relatos de ocorrência significativa de esterigmatocistina. Em 1968, nos E.U.A., amostras de vários alimentos produziram resultados negativos. No período de 1974-75, 574 amostras de cereais diversos também não indicaram presença de esterigmatocistina. Na República Federal Alemã, na mesma época, 142 amostras de milho, frutas e verduras também não apresentaram a toxina (Stoloff, 1982).

Relatos de contaminação por esterigmatocistina, no momento estão confinados a amostras de trigo, café crú e nozes pecans visivelmente mofadas. Um levantamento realizado simultaneamente nos E.U.A. (216 amostras) e na Itália (502 amostras) com café crú, não

exibiu resultados positivos. Na Holanda, onde 9 de 39 amostras de queijo apresentaram níveis de esterigmatocistina que chegaram até 600 µg/kg, descobriu-se que a toxina limitava-se à casca dos queijos contaminados (Stoloff, 1982). Subseqüentemente, na Alemanha, numa amostragem abrangente porém inadequada devido ao pequeno número de amostras por país, 49 amostras de queijo foram examinadas sem que fosse encontrada contaminação (7 dinamarqueses, 9 alemães, 2 ingleses, 10 franceses, 2 italianos, 6 holandeses, 2 noruegueses e 11 suíços) (Nowotny *et al.*, 1983a).

Aflatoxina

A aflatoxina tem sido a micotoxina com mais resultados positivos relatados no mundo inteiro. Nos E.U.A. tem sido encontrada com freqüência em amostras de amendoim, milho e semente de algodão de origem nacional. Uma correlação estreita entre região geográfica e teor de toxina foi evidenciada. O grau de contaminação e a área envolvida variam de ano para ano, existindo uma ligação aparente com períodos extremos de temperatura e de seca. Em números, 42 a 93% do milho proveniente do sudeste americano é contaminado, em maior ou menor grau dependendo do ano, enquanto o milho colhido no meio-oeste é consistentemente isento de aflatoxina (Stoloff, 1982). Já no caso do amendoim, os estados de Georgia, Florida e Alabama são considerados de alto risco quando comparados com os estados de Virgínia, Carolina, Texas e Oklahoma (Stoloff, 1979). De uma maneira não significativa, esporádica e em níveis baixos, centeio, sorgo, trigo, amendoim, nozes pecans, nozes e sementes de girassol, produzidos nos Estados Unidos, tem exibido contaminação (Stoloff, 1982). Digno de menção está o levantamento realizado de 1968-75 em 3489 amostras de trigo, aveia, centeio, cevada, sorgo, arroz e painço. Somente dezoito amostras continham aflatoxina e ainda assim o valor médio ficou

em 5 $\mu\text{g/kg}$ (Osborne, 1982).

Em 1977, amostras de milho tomadas antes da colheita em dois estádios de maturação provenientes de 45 condados do estado da Georgia, revelaram uma incidência de aflatoxina numa faixa de 0 a 4708 $\mu\text{g/kg}$. A repetição do trabalho em 1978 mostrou 94% de amostras contaminadas no estágio menos maduro e 76% no estágio mais maduro. A faixa de aflatoxina foi de 0 a 620 $\mu\text{g/kg}$, portanto bem mais baixo que 1877 (Mc Milliam et al., 1980). Em 1980 e 1981, amostras provenientes de 64 campos de sorgo de diferentes partes do estado da Georgia exibiram 56% de contaminação com níveis de 1 a 90 $\mu\text{g/kg}$. Em 1981, amostras de 15 campos do delta do rio Mississippi não estavam contaminadas (Mc Milliam et al., 1983).

Dentre os artigos importados pelos E.U.A., castanha do pará, copra e pistache tem mostrado uma ocorrência significativa enquanto avelãs, sementes de abóbora e melão, gengibre e noz moscada, teores e frequência baixos (Stoloff, 1982).

No fim da década de 70 e início de 80, entidades ligadas à saúde pública no Canadá, realizaram levantamentos envolvendo centenas de amostras de alimentos e rações produzidos no país e importados. Chegaram à conclusão que aflatoxina não é um problema para alimentos de origem local (Trenholm et al., 1985). De maneira semelhante às conclusões chegadas nos E.U.A., os relatos canadenses também indicam que o padrão de ocorrência de contaminação em cereais é dependente da localização geográfica e zona bioclimática além da sazonalidade (Abramson e Mills, 1985).

No período de 1982-83, 333 amostras de diversos tipos de grãos (milho, trigo, aveia, cevada, amendoim, girassol, semente de algodão e soja) foram analisados na África do Sul. Aflatoxina B_1 dominou como contaminante, incidindo em 25,5% dos casos, em teores de 5 a 2000 $\mu\text{g/kg}$ (Dutton e Westlake, 1985).

Na República Federal Alemã, país tipicamente importador de alimentos que compra no estrangeiro 85% do que consome (Frank, 1981) no fim da década de 70 examinou milhares de amostras de alimentos diversos. Mais uma vez, o amendoim aparece como principal veículo de aflatoxina. Castanha do pará, pistache e amêndoas apresentaram alguma contaminação. Uma incidência rara e em baixos teores foi exibida por produtos de cenoura, ketchup, pães, aveia, óleo de girassol, massas alimentícias, fígados de bovinos, suínos e aves de corte (Woller, 1981).

Relato interessante nos vem da Polônia, onde, durante um período de 5 anos, 3100 amostras de amendoim sendo importado, principalmente da Índia, foram examinadas. Todas as amostras deram resultados positivos com teores que iam de 20 a 8500 µg/kg (Kmieciak, 1976).

Na Inglaterra, órgãos de fiscalização afirmam que a incidência de aflatoxina em alimentos entregues ao consumo humano vem a ser próxima de zero. O único produto objeto de preocupação tem sido o leite, devido à aflatoxina M_1 . Esta conclusão foi fruto de vários anos de levantamentos. Como exemplo, temos em 1975 a análise de 113 amostras de cereais diversos com nenhum resultado positivo. Assim como em 1978-79, 200 amostras de farinha de trigo foram examinadas e nenhuma contaminação foi observada. Neste caso, além da aflatoxina, também a ocratoxina A, a zearalenona e a esterigmatocistina foram pesquisadas (Osborne, 1982).

2.3. Levantamentos Realizados no Brasil

Poucos levantamentos foram realizados no Brasil até agora. Desta maneira não temos até o momento um quadro da situação no país. A maior parte dos trabalhos foi realizada no estado de São Paulo e

abordando tão somente as aflatoxinas.

Em 1965, encontramos o trabalho pioneiro de Tango et al. em amostras de amendoim de safras de períodos secos e de períodos chuvosos. Utilizando cromatografia em papel, examinaram 72 amostras e encontraram que 14,3% das amostras do período seco contra 24,3% do período das chuvas continham mais que 100 µg/kg de aflatoxina B₁.

Também em 1965, Menezes et al., realizaram um levantamento em 43 indústrias de óleo do estado de São Paulo, totalizando 105 amostras, sendo 41 de sementes, 33 de tortas e 31 de farelos de amendoim. Este grupo concluiu que apenas 3,2% dos farelos e 3,0% das tortas poderiam ser consumidos por animais.

No período de 1969-70, 32 amostras de alimentos e 130 amostras de rações foram analisadas. Contaminação por aflatoxina B₁ foi constatada em 20 amostras de alimentos e 104 das amostras de rações (Pregmolato e Sabino, 1969-70).

Em 1970, foram examinadas 30 amostras de pasta de amendoim, 20 nacionais e 10 de procedência americana. Apenas 3 amostras todas importadas, não apresentaram aflatoxina. Os resultados positivos variaram de 0,05 µg/kg a superiores a 1000 µg/kg em termos de aflatoxina B₁ (Fonseca, 1970).

Outros tipos de alimentos foram vistos por Purchio (1970) (1972) (1976) e Eiroa e Arckoll (1978). Purchio analisou farinha de trigo, farinha de mandioca e "misso" (20 amostras de cada), constatando a presença de aflatoxina B₁ em farinha de trigo e "misso" (2 e 3 amostras respectivamente). Eiroa e Arckoll não encontraram aflatoxinas, esterigmatocistina e patulina em 67 amostras de farinha de trigo, milho, mandioca e soja examinadas.

De 1971 a 1979, 572 amostras de amendoim e derivados, farinha de soja, milho, trigo, aveia, mandioca, arroz, alimentos preparados industrialmente e vários tipos de ração animal foram anali-

sadas também para aflatoxina. Amostras contaminadas foram encontradas em todos os tipos de alimentos compreendendo 146 do total, numa faixa de 50 a 7800 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxina B_1 (Sabino, 1980).

De 1973 a 1975, a ocorrência de aflatoxina em 264 amostras de amendoim empregado como matéria prima por 40 fábricas de óleo localizadas em quatro regiões do estado de São Paulo foi examinada por Fonseca. Todas as amostras exibiram resultados positivos, numa faixa de 0,1 a 200 mg/kg . Uma correlação positiva tornou-se evidente entre estação chuvosa na época da colheita e teores mais elevados de aflatoxina nas amostras. Duas regiões do estado apresentaram consistentemente teores mais elevados indicando a importância do fator geográfico na incidência da toxina.

Fonseca (1976) examinou também amostras de amendoim "in natura" e 80 amostras de farelo, respectivamente matéria-prima e sub-produto de fábricas de óleo localizadas em quatro outras regiões do Estado de São Paulo. Além de constatar uma contaminação em 85 a 99% das amostras, evidenciou que as condições de armazenamento nas fábricas contribuíam muitas vezes para um aumento no nível da toxina.

Sabino e Correa (1981) examinaram 100 amostras de feijão cultivado em várias partes do estado de São Paulo. Encontraram aflatoxina em 10% das amostras em teores de 30 a 500 $\mu\text{g/kg}$. Em outra série análises, que abordou pasta de amendoim e paçoca, Sabino et al. (1982) mostraram uma contaminação de 18 a 26% das amostras.

Ocratoxina A, zearalenona e aflatoxina foram pesquisadas em 742 amostras de alimentos nacionais também no estado de São Paulo. Os alimentos em questão incluíram amendoim cru e torrado, paçoca, manteiga de amendoim, soja, milho, queijo curado, salame e copa. Ocratoxina e zearalenona não foram encontradas. Aflatoxina estava presente em amendoim e seus produtos assim como em milho (Fon-

seca et al., 1983).

O único trabalho relatado na literatura realizado fora do estado de São Paulo, foi executado em Belo Horizonte, MG, onde 32 amostras de amendoim crú, 13 de amendoim torrado, 62 de produtos derivados, 14 de farinha de trigo, 32 de farinha de milho e derivados e 24 de farinha de mandioca foram analisadas para aflatoxina B₁. Somente amendoim e seus produtos apresentaram aflatoxina, com 44% acima de 30 µg/kg (Prado, 1983).

No período de 1980 a 1982, Scussel e Rodriguez-Amaya (1985) examinaram 241 amostras de amendoim e seus produtos (amendoim crú com casca e sem casca, frito salgado com e sem película, amendoim japoneses, ovinho de amendoim, amendoim doce colorido, amendoim recoberto com chocolate, pasta de amendoim, paçoca e pé-de-moleque. De 241 amostras, 92 estavam acima de 30 µg/kg (B₁ + G₁).

Scussel (1984) verificou a possibilidade de contaminação de milho no campo, realizando amostragens em quatro cultivares diferentes em três estádios de maturação (estádios verde, pastoso e seco) com resultados negativos. Também analisou 63 amostras de milho e seus produtos (farinha de milho amarela e branca, milho verde, fubá, flocos de milho cozido e sêmola), obtendo resultados negativos.

2.4. Métodos Analíticos

2.4.1. Triagem

A necessidade de determinar rapidamente a presença ou não de micotoxinas em partidas de cereais deu lugar ao desenvolvimento de métodos de triagem. Este tipo de teste ocasiona ganhos sensíveis

em tempo de análise e reagentes. As cargas de grãos correspondentes às amostras negativas na triagem podem ser imediatamente liberadas ao fim a que se destinam, eliminando a etapa de análise quantitativa e procedimento de confirmação da micotoxina.

A triagem tem sido realizada principalmente por minicoluna e cromatografia em camada delgada. Minicoluna enfoca uma única micotoxina e devido a isso é mais rápida, tomando apenas 30 a 40 minutos. Camada delgada engloba um grande número de micotoxinas e é necessariamente mais elaborada exigindo um período maior de análise podendo chegar a um dia ou mais. Ambos os sistemas incluem necessariamente etapas de extração da amostra e limpeza do extrato.

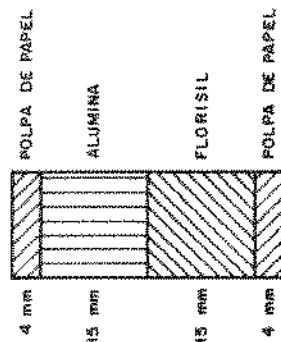
A primeira minicoluna foi proposta em 1968 por Holaday e consistiu de sílica gel desenvolvida por capilaridade. Velasco (1972) idealizou o desenvolvimento por gravidade assim como a interface sílica gel/florisil que provou ideal para aflatoxinas. Romer (1975) e Holaday e Lansden (1975) propuseram modificações da coluna de Velasco (Figura 5). Duas minicolunas foram desenvolvidas para a ocratoxina A (Holaday, 1976), (Hald e Krogh, 1975) e uma para zeaxalenona (Holaday, 1976) (Figura 5). Porém, nenhuma delas se tornou de uso comum como ocorreu com as de aflatoxina.

A triagem em camada delgada é realizada submetendo as diversas placas contendo amostras e padrões a desenvolvimentos em sistemas de solventes diferentes. Em adição, reagentes capazes de modificar a intensidade e/ou a cor da fluorescência das micotoxinas ou ainda dar origem a uma cor perceptível sob luz na faixa visível do espectro são empregados (Tabela 3).

Além desses, dois métodos específicos para aflatoxina em milho são conhecidos, o BGYF (Bright Greenish Yellow Fluorescence) e o FL-IRS (Fluorometric Iodine Rapid Screen). No método BGYF, a presença de pontos fluorescentes característicos é verificada nos

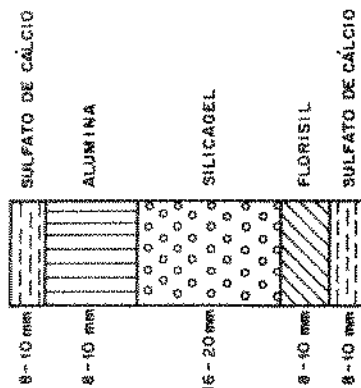
AFLATOXINAS

HOLADAY E LANSDEN (1975)



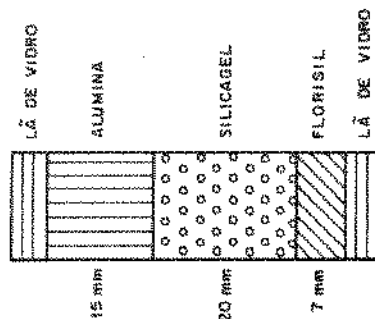
- a) tolueno
- b) diclorometano - acetona (85/15)

ROMER (1975)



- a) clorofórmio
- b) clorofórmio - acetona (9+1)

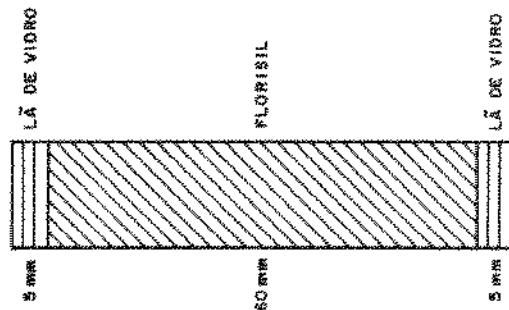
VELASCO (1972)



- clorofórmio - acetona (9+1)

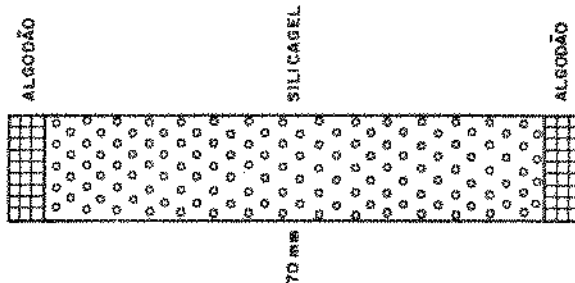
OCRATOXINA A

HOLADAY (1976)



- a) benzeno
- b) metanol
- c) 0.25 N H_2SO_4

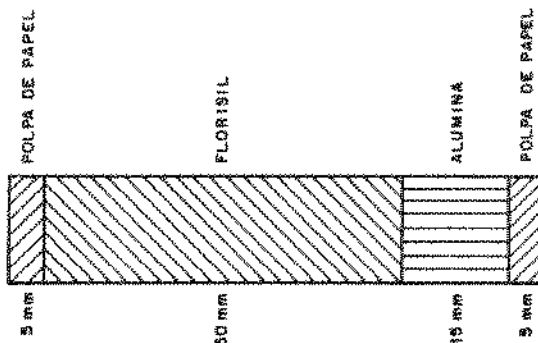
HALD E KROGH (1975)



- a) clorofórmio
- b) tolueno - acetato de etila - ácido fórmico (5+4+1)

ZEARALENONA

HOLADAY (1976)



- a) benzeno
- b) hexano - acetona (9+1)

FIG. 5 - Minicolumnas e seus solventes de desenvolvimento para triagem de micotoxinas.

Tabela 3

Triagem por cromatografia em camada delgada

Autor	Micotoxinas Separadas	Camada Delgada	Solventes p/ desenvolvimento	Reagentes p/ nebulização
Nowotny <u>et al.</u> (1983b)	22	sílica gel	3	5
Gimeno (1979)	16	sílica gel F ₂₅₄	29	7
Corst-Allman e Steyn (1979)	13	sílica gel F ₂₅₄	13	6
Durackova <u>et al.</u> (1976)	37	sílica gel	8	2
Grabarkiewicz- Szczesna <u>et al.</u> (1985)	11	sílica gel sílica gel c/ H ₂ SO ₄ sílica gel c/ ácido oxálico	13	5

grãos como indicador da presença de Aspergillus flavus e parasiticus (Shotwell et al., 1975). O FL-IRS compreende uma extração com metanol-água, clarificação com acetato de zinco e tratamento do extrato resultante com iodo. A fluorescência da solução medida com um fotofluorímetro e comparada com padrões decide tratar-se ou não de uma amostra positiva (Davis e Diener, 1979).

2.4.2. Cromatografia em Camada Delgada

Os métodos mais conhecidos e mais empregados para determinação de uma única micotoxina empregam os sistemas de extração e limpeza apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6. Os sistemas solventes utilizados no desenvolvimento das placas assim como a recuperação e os limites de detecção relatados para os mesmos métodos podem ser apreciados nas Tabelas 7 e 8 respectivamente.

Em alguns dos métodos desenvolvidos a partir da década de 60, foi empregada a extração por Soxhlet por 7 ou 12 horas (Mirocha et al., 1974, Steyn e van der Merwe, 1966). Logo foi percebida a inconveniência deste procedimento que caiu conseqüentemente em desuso. Atualmente, são utilizados o agitador mecânico, por 1/2 ou 1 hora (Nesheim et al., 1973, Stack e Rodricks, 1971) ou o liquidificador, por 3-5 minutos (Asensio et al., 1982, Scott e Hand, 1967, Shannon e Shotwell, 1976). Em alguns casos, os dois sistemas são considerados intercambiáveis (Romer, 1975, Stoloff e Scott, 1984).

Luz ultra-violeta de comprimento de onda longo (366 nm) é utilizada para visualização da ocratoxina A e das aflatoxinas. A ocratoxina A apresenta uma fluorescência verde-azulada, enquanto as aflatoxinas B₁ e B₂, azul e as aflatoxinas G₁ e G₂, verde. Gimeno (1979), Golinski e Grabarkiewicz-Szczesma (1984), Miguel e De Andres (1982) assim como Takeda et al. (1979) expõem a placa a vapores de amônia para em seguida nebulizar com solução alcoólica de cloreto

Tabela 4

Sistemas de extração e limpeza em métodos que determinam ocratoxina A.

Peso de amostra (g)	Solvente para Extração	Vol. de solvente (mL)	Limpeza	Material Analisado	Referências
25	Metanol-H ₂ O (55 + 45) Hexano	125 50	Coluna de celite	Trigo, milho, cevada, arroz	Scott e Hand (1967)
20	Clorofórmio-metanol (1 + 1)	---	Partição p/0.1 M NaHCO ₃ Partição p/Clorofórmio	Aveia, coco, ervilhas	Steyn e Van Der Merwe (1966)
50	Acetonitrilo-4% KCl-6 N HCl (88 + 10 + 2)	200	Desengorduramento c/ciclohexano Partição p/ Diclorometano	Geral	Asensio et al. (1982)
50	Clorofórmio-0.1 M H ₃ PO ₄ (10 + 1)	275	Coluna de celite c/ NaHCO ₃	Cevada	A.O.A.C. (1984) Nesheim et al. (1973)

Tabela 5

Sistemas de extração e limpeza em métodos que determinam zearalenona e esterigmatocistina.

Zearalenona

Peso de Amostra (g)	Solvente para Extração	Vol. de solvente (mL)	Limpeza	Material Analisado	Referências
100	Acetato de etila	---	Partição p/1 N NaOH Partição p/clorofórmio	Ceral	Mirocha et al. (1974)
50	Clorofórmio-H ₂ O (10 + 1) Terra diatomácea	275 25 (g)	Coluna sílica gel	---	A.O.A.C. (1984)

Esterigmatocistina

50	Acetonitrilo-4% KCl (9 + 1)	200	Desengorduramento c/ hexano Partição c/clorofórmio Opcional: coluna sílica gel		Stack e Rodricks (1971) A.O.A.C. (1984)
50	Acetonitrilo-4% KCl (9 + 1)	200	Coluna de florissil	Cereais em grãos	Shannon e Shotwell (1976)

Tabela 6

Sistemas de extração e limpeza em métodos que determinam aflatoxina.

Peso de Amostra (g)	Solvente para Extração	Vol. de solvente (mL)	Limpeza	Material Analisado	Referências
50	Acetona-H ₂ O (85 + 15)	250	Clarificação c/ NaOH, FeCl ₃ , CuCO ₃ , Celite Partição p/clorofórmio	Geral	Romer (1975) A.O.A.C. (1984)
50	Clorofórmio-H ₂ O (10 + 1) Terra diatomácea	275 25 (g)	Coluna sílica gel	Amendoim e derivados	A.O.A.C. - C.B. (1984)
50-100	Metanol + H ₂ O (55 + 45) Hexano NaCl sólido	250-500 100-200 4 (g)	Partição p/Clorofórmio	Amendoim e derivados	A.O.A.C. - B.F. (1984)
50	Acetona-H ₂ O (85 + 15)	250	Clarificação c/ Aceta- to de Chumbo ou Aceta- to de chumbo + Acetato de Zinco + Cloreto de Alumínio Partição p/Diclorometano Coluna de sílica gel	Sementes de Algodão	A.O.A.C. (1984)

Sistemas solventes para desenvolvimento em camada delgada de sílica gel.

Métodos para determinação de uma única micotoxina.

Micotoxina	Sistema Solvente	Referências
Ocratoxina A	Benzeno-Metanol-Ác. Acético (18 + 1 + 1)	A.O.A.C. (1984)
	Tolueno-Acetato de etila-Ác. Fórmico 90% (5 + 4 + 1)	Scott e Hand (1967)
Esterigmatocistina	Benzeno-Ác. Acético-Metanol (90 + 5 + 5)	A.O.A.C. (1984)
	Benzeno-Etanol-Ác. Acético (90 + 5 + 5)	Stack e Rodricks (1971)
		Shannon e Shotwell (1976)
	Benzeno-Ác. Acético	Wilson et al. (1976)
Zearalenona	Etanol-Clorofórmio (5 + 95) ou (3.5 + 96.5)	A.O.A.C. (1984)
	Ácido Acético-Benzeno (5 + 95) ou (10 + 90)	A.O.A.C. (1984)
	Clorofórmio-Etanol (97 + 3)	Mirocha et al. (1974)
Aflatoxina		Pomer (1975)
		A.O.A.C. - C.B. (1984)
		A.O.A.C. - B.F. (1984)
	Clorofórmio-Acetona (9 + 1)	Wilson et al. (1976)
		Josefsson e Moller (1977)
		Stoloff et al. (1971)

Tabela 8

Recuperação e limite de detecção relatados em métodos que determinam uma única micotoxina.

Referências	Micotoxina	Lim. Det. (µg/kg)	% Recuperação
Scott e Hand (1967)	Ocratoxina A	25	80-100
Nesheim <u>et al.</u> (1973)	Ocratoxina A	12	37-115
Asensio <u>et al.</u> (1982)	Ocratoxina A	2,5-4	96
Steyn e Van Der Merwe (1966)	Ocratoxina A	100	--
Mirocha <u>et al.</u> (1974)	Zearalenona	50	83
Shannon e Shotwell (1976)	Esterigmatocistina	50	92-134
Stack e Rodricks (1971)	Esterigmatocistina	200	90-100
Romer (1975)	Aflatoxina B ₁	5-15	94
	" B ₂	"	108
	" G ₁	"	130
	" G ₂	"	103

de alumínio e aquecer a 105°C por 5 ou 10 minutos. Com este recurso afirmam intensificar a fluorescência da ocratoxina A. Exposição unicamente a vapores de amônia é recomendada com a mesma finalidade por Eppley (1968) e Le Tutour et al. (1984). A fluorescência da esterigmatocistina e da zearalenona a 366 nm é bem mais fraca que a ocratoxina A e as aflatoxinas. Para conseguir um melhor limite de detecção, uma intensificação da fluorescência é conseguida com nebulização de uma solução de cloreto de alumínio e aquecimento em estufa a 105°C por 5-10 minutos (Miguel e De Andres, 1982, Wilson et al., 1976, Josefsson e Moller, 1977, Gimeno, 1979, Stoloff e Scott, 1984, Roberts et al., 1981).

A necessidade de confirmação da identidade da micotoxina seja por reações de derivação ou por espectrometria de massa, é bem salientada por Nesheim (1979) quando expressa que "temos tido mais relatos falsos da ocorrência de aflatoxina em alimentos que a maioria dos analistas gostariam de admitir. A importância, portanto, de uma confirmação positiva da identidade do suspeito dificilmente pode ser enfatizada o suficiente". E ainda "A preparação de derivados químicos com propriedades cromatográficas modificadas é o método mais simples de confirmação... Re-cromatografia com solventes e adsorventes diferentes adiciona evidência corroborativa mas não conclusiva da identidade. Esse tipo de evidência pode ser conclusivo somente no sentido negativo, isto é, pode mostrar que uma mancha desconhecida não é aflatoxina". Também Pohland et al. (1981) frisa que "nenhum método analítico está completo sem a inclusão de uma etapa de confirmação de identidade".

Para confirmação da ocratoxina A, a esterificação com metanol em presença de trifluoreto de boro é preconizada pela A.O.A.C. (1984). Trata-se de um procedimento laborioso, onde o extrato clorofórmico da amostra passa primeiro por limpeza em coluna de terra diatomácea alcalinizada com NaHCO_3 . Sofre então esterificação segui

da de uma sucessão de partições que tem a finalidade de completar a limpeza do extrato.

Já Hunt et al. (1980) propõem tratar o extrato diretamente com trifluoreto de boro em metanol. Nenhuma etapa de limpeza anterior à esterificação é empregada.

Diversos autores utilizam a exposição a vapores de amônia e a nebulização com solução de cloreto de alumínio, em separado ou em conjunto, como confirmação da presença de ocratoxina A. Estes tratamentos modificam a fluorescência nativa da ocratoxina A de verde azulado para azul (Miguel e De Andres, 1982, Takeda et al., 1979, Gimeno, 1979, Le Tutour et al., 1984, Eppley, 1968).

Roberts et al. (1981) empregam três reações diferentes na confirmação: hidrólise ácida, acetilação e esterificação. Scott e Hand (1967), num procedimento que não pode ser conclusivo, preferem desenvolver os extratos suspeitos e o padrão em benzeno-metanol-ácido acético (24 + 2 + 1) com exposição subsequente a vapores de amônia ou nebulização com solução de trietilamina. Repetem então o processo, re-aplicando os extratos das amostras e do padrão em uma nova placa e procedendo ao desenvolvimento desta vez em tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5 + 4 + 1).

Golinski e Grabarkiewicz-Szczesma (1984) desenvolvem previamente a placa com amostra e padrões em tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (6 + 3 + 1) para em seguida expô-la a vapores de piridina e anidrido acético. Novo desenvolvimento é realizado no mesmo solvente antes da avaliação do resultado.

Para aflatoxina a formação de derivados é levada a cabo com duas porções do extrato que são tratadas independentemente, a primeira com água e ácido clorídrico e a segunda com anidrido acético e ácido clorídrico. Após desenvolvimento em camada delgada juntamente com os padrões similarmente tratados e a amostra e o padrão

originais, a confirmação será positiva se o Rf da mancha de aflatoxina presuntiva sempre coincidir com o Rf do padrão que sofreu o mesmo tipo de tratamento (A.O.A.C. (1984), Nesheim et al. (1973) e Roberts et al. (1981)).

Przybylski (1975) desenvolveu uma reação para as aflatoxinas diretamente na placa que foi endossada pela A.O.A.C. (1984) e vários autores (Wilson et al., 1976, Miguel e De Andres, 1982, Le Tutour et al., 1984, Stack e Pohland, 1975). Na placa aplica-se de um lado a amostra e o padrão e de outro lado novamente amostra e padrão sobre os quais coloca-se uma gota de ácido trifluoroacético. Após evaporação do ácido e desenvolvimento, uma coincidência dos Rfs da amostra e padrão tratados, por um lado, e dos Rfs da amostra e padrão não tratados, por outro lado, vem a indicar um resultado positivo.

Para confirmação da esterigmatocistina, a A.O.A.C. recomenda a preparação de dois derivados diferentes. Após uma etapa de cromatografia preparativa em camada delgada, seguida de limpeza por partição, o extrato da amostra tem uma alíquota tratada com HCl e outra com piridina e anidrido acético. Alíquotas de padrão são tratadas de maneira semelhante.

Gimeno (1979) confirma a esterigmatocistina expondo a placa, após nebulização com AlCl_3 , à luz ultra-violeta de ondas longas e curtas. Já Golinski e Grabarkewicz-Szczesma (1984) propõem desenvolvimento em dois tipos de camada delgada, uma impregnada com 0.6 N H_2SO_4 e outra impregnada com ácido oxálico. Após desenvolvimento, realizam uma nebulização com AlCl_3 20%. Neste último caso, trata-se de um procedimento cujos resultados são corroborativos mas não comprobatórios da presença da toxina.

No caso da zearalenona, a confirmação é feita observando-se a placa a 254 nm e a 366 nm. Sob luz ultravioleta de ondas cur-

tas, a fluorescência é intensificada e apresenta-se verde azulada (A.O.A.C., 1984).

Representativo deste tipo de estudo colaborativo está a comparação entre os métodos C.B. e B.F. da qual participaram 13 analistas. Os coeficientes de variação alcançados foram 30 e 37% para B.F. e C.B., respectivamente nos resultados inter-laboratoriais. Nos resultados internos dos laboratórios, os coeficientes de variação foram 40 e 38% para B.F. e C.B. respectivamente (Eppley et al., 1968).

Este tipo de resultados levou ao consenso expresso por Schuller et al. (1976) que "na ordem de 10 µg/kg de aflatoxina, os métodos de análise que alcançaram coeficientes de variação de 30-40%, com recuperações de 70% ou maiores, em estudos colaborativos inter-laboratoriais, podem ser considerados capacitados como métodos de referência".

A necessidade de um cuidado especial com os padrões é bem demonstrada por uma verificação na precisão dos padrões realizada pela American Oil Chemists Society, que enviou uma solução de aflatoxina para ter sua concentração estimada por diversos laboratórios. Um coeficiente de variação de 80% entre os resultados, indicou que padrões de referência podem vir a ser ponto fraco de muitas análises (Horwits et al., 1980).

Uma melhoria na repetibilidade das determinações quantitativas por camada delgada é obtida com densitometria. Com fluorodensitômetro, padrões de aflatoxinas podem ser estimados com um coeficiente de variação de 5% (Beckwith e Stoloff, 1968).

Com a inclusão de cromatografia de alta eficiência e de densitometria no arsenal dos analistas de micotoxinas, os programas de verificação da qualidade analítica e os estudos colaborativos

vem indicar que a etapa instrumental não tem sido a decisiva para obtenção de bons resultados.

Métodos para determinação simultânea de micotoxinas tem sido uma ambição dos analistas, devido a grande economia em tempo e material. Os sistemas de extração e limpeza dos métodos para determinação múltipla mais conhecidos podem ser apreciados na Tabela 9. Solventes para separar diversas micotoxinas na camada delgada estão na Tabela 10.

Alguns outros sistemas mais complexos são propostos por outros autores. Miguel e De Andres (1982), por exemplo, sugerem o emprego de 8 solventes para diferentes placas aplicadas com padrões e amostra (Tabela 11).

Josefsson e Moller (1977) recomendam cromatografia bi-dimensional para amostras difíceis. Utilizam como primeiro solvente benzeno-acetato de etila-ácido fórmico (80 + 29 + 0,5) ou clorofórmio-acetona (9 + 1) seguido de clorofórmio-4-metil-2-pentanona-ácido fórmico (93 + 7 + 0,2).

Roberts et al. (1981) aconselham a cromatografia bi-dimensional para separar aflatoxinas e ocratoxina A. No primeiro desenvolvimento utilizam tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (60 + 30 + 10) e no segundo clorofórmio-acetona (9 + 1).

Patterson e Roberts (1979) advogam um sistema de cromatografia bi-dimensional para cada separação de micotoxina conforme pode ser visto na Tabela 12.

A recuperação e o limite de detecção relatados pelos autores dos métodos estão na Tabela 13.

Estimativas visuais da intensidade da fluorescência de padrões de aflatoxinas em camada delgada mostram um coeficiente de

Sistema de extração e limpeza em métodos para determinação simultânea de micotoxinas

Micotoxinas	Peso da amostra (g)	Solvente de Extração	Vol. de solvente (ml)	Limpeza	Material Analisado	Referências
Aflatoxina Zearalenona	50	Metanol-H ₂ O (6 + 4)	250	Adição NaCl Desengorduramento c/ Hexano Partição p/ Clorofórmio Clarificação c/ CaCO ₃ básico	Milho	Thomas et al. (1975)
Aflatoxina Ocratoxina A Zearalenona	30	Metanol-H ₂ O (10 + 1)	120	Adição KCl Desengorduramento c/ Hexano Partição p/ Clorofórmio	Diversos	Miguel e De Andres (1982)
Aflatoxina Ocratoxina A Ac. penicílico Citrinina	50	Clorofórmio-0.5 N H ₃ PO ₄ (10 + 1)	275	Fracionamento coluna sílica gel	Diversos	Wilson et al. (1976)
Ao todo 8, inclusive: Ocratoxina A Esterigmatocistina Zearalenona Aflatoxina B	50	Acetonitrilo-0.1 N H ₃ PO ₄ (10 + 1)	275	Adição Na H CO ₃ +NaCl Desengorduramento c/ Isotano Fracionamento por partição em meios ácidos e básicos	Rações	van Eyndt et al. (1979) (a)
Ao todo 8, inclusive: Ocratoxina A Esterigmatocistina Zearalenona Aflatoxina B	50	Acetonitrilo-0.1 N H ₃ PO ₄	275	Desengorduramento c/ Isotano Cromatografia em coluna de gel de polimida Partição por extratos p/ clorofórmio	Rações	van Eyndt et al. (1979) (b)
Aflatoxina (a) Ocratoxina (b) Zearalenona e Ac. Secalônico (c)	50	Clorofórmio-1 M H ₃ PO ₄ (10 + 1)	275	(a) Coluna sílica gel (b) 2 partições (c) 2 partições	Poeira de Silos	Ehrlich e Lee (1984)
Ao todo 10, inclusive: (Aflatoxina, Ocratoxina A, Esterigmatocistina, Zearalenona)	25	Acetonitrilo-4% KCl (9 + 1)	100	Desengorduramento c/ Isotano Partição p/ Clorofórmio Acidificação e Diálise Partição p/ Clorofórmio	Rações	Roberts e Patterson (1975)
Aflatoxina Ocratoxina Zearalenona	50	Clorofórmio-H ₂ O (10 + 1)		Fracionamento em coluna sílica gel	Diversos	Appley (1968)
Aflatoxina Zearalenona	50	Metanol	50	Desengorduramento c/ Freon 113 (NH ₄) ₂ SO ₄ Partição p/ Clorofórmio	Milho	Seitz e Mohr (1976)
Aflatoxina Ocratoxina A	50	Metanol-4% NaCl (6 + 4)	300	Desengorduramento c/ Hexano Partição p/ CHCl ₃	Azeitonas Pretas	Le Tuteur et al. (1984)
Aflatoxina Ocratoxina A Zearalenona	25	Acetonitrilo-H ₂ O (9 + 1)	100	Fracionamento p/ partição em meios ácidos e básicos	Milho	Balzer et al. (1978)
14 micotoxinas inclusive: Ocratoxina A, Zearalenona, Esterigmatocistina, Aflatoxina	50	20% H ₂ SO ₄ -4% KCl-Acetonitrilo (2 + 20 + 178)	200	Desengorduramento c/ Isotano Fracionamento em coluna sílica gel	Grãos	Takeda et al. (1979)
Aflatoxina Ocratoxina A Zearalenona Esterigmatocistina Patulina	50	Acetonitrilo-4% KCl (9 + 1)	200	Desengorduramento c/ Isotano Partição p/ CHCl ₃	Geral	Stoloff et al. (1971)
Aflatoxina Ocratoxina A	10	Clorofórmio-H ₂ O (10 + 1)	55	Sep-Pak	Rações	Roberts et al. (1981)
Ocratoxina A Patulina Esterigmatocistina Zearalenona	50	Clorofórmio-0.1 M H ₃ PO ₄ (10 + 1)	275	Filtração em gel	Cereais	Josefsson e Møller (1977)
22 micotoxinas inclusive: Aflatoxina Ocratoxina A Zearalenona Esterigmatocistina	0.5-5	Metanol	100	Acidificação Desengorduramento c/ Hexano Partição p/ Clorofórmio	Diversos	Nowotny et al. (1983)

Sistemas solventes para desenvolvimento em camada delgada de sílica gel
Métodos para determinação simultânea de micotoxinas

Micotoxinas	Solvente	Referências
Aflatoxina Ocratoxina A Esterigmatocistina	Tolueno-Acetato de etila- Clorofórmio-Ác. Fórmico (7 + 5 + 5 + 2)	Gimeno (1979)
Aflatoxina Esterigmatocistina Zearalenona	Clorofórmio - Acetona (9 + 1)	Nowotny <u>et al.</u> (1983)
Zearalenona Ocratoxina A	Benzeno - Ác. Acético (9 + 1)	Eppley (1968)
Zearalenona Ocratoxina A	Benzeno-Clorofórmio-Acetona (45 + 40 + 15)	Seitz e Mohr (1976)
Aflatoxina Ocratoxina	(a) Benzeno-Hexano (3 + 1) (b) Tolueno-Acetato de etila- Ác. Fórmico (60 + 30 + 15)	Le Tutour <u>et al.</u> (1984)
Aflatoxina Ocratoxina A Zearalenona	Tolueno-Acetato de etila- Ác. Fórmico (5 + 4 + 1)	Balzer <u>et al.</u> (1978)
Zearalenona Esterigmatocistina Aflatoxina	Clorofórmio-Metanol-H ₂ O-Ác. Fórmico (90 + 10 + 1 + 1)	Takeda <u>et al.</u> (1979)
Aflatoxina Ocratoxina A Zearalenona Esterigmatocistina	Benzeno-Metanol-Ác. Acético(18+1+1) Hexano-Acetona-Ác. Acético(18+2+1) Clorofórmio+Ác. Acético+Éter etílico(17+1+3) Clorofórmio + Acetona (9 + 1)	Stoloff <u>et al.</u> (1971)*
Aflatoxina Ocratoxina A Patulina Esterigmatocistina Zearalenona	(a) Benzeno-Hexano (3 + 1) (b) Benzeno-Acetato de etila-Ác. Fórmico (80 + 20 + 0.5)	Josefsson e Moller (1977)
Aflatoxina Zearalenona	Clorofórmio-Acetona (96 + 4)	Thomas <u>et al.</u> (1975)
Ocratoxina A Ác. Penicílico	Acetato de etila-Clorofórmio-Ác. Fórmico (60 + 40 + 1)	Wilson <u>et al.</u> (1976)

Solvente (a) e (b) devem suceder-se na mesma placa.

* Solvente para desenvolver placas diferentes.

Tabela 11

Solventes para cromatografia unidimensional em camada delgada para aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona (Miguel e De Andres, 1982).

Tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5 + 4 + 1)
Tolueno-acetato de etila-clorofórmio-ácido fórmico (38 + 26 + 26 + 10)
Benzeno-éter etílico-ácido acético (82 + 14 + 4)
Clorofórmio-éter etílico-ácido acético (82 + 14 + 4)
Benzeno-tetracloreto de carbono + n-butanol-etil acetil éter-ácido fórmico (36 + 24 + 20 + 19 + 1)
Benzeno-acetona-ácido fórmico (78 + 20 + 2)
Clorofórmio-etil acetil éter-ácido fórmico (60 + 38 + 2)
Clorofórmio-acetona-ácido fórmico (78 + 20 + 2)

Tabela 12

Solventes para cromatografia bi-dimensional em camada delgada (Patterson e Roberts, 1979):

Micotoxina	Solvente 1	Solvente 2
Aflatoxina	Éter etílico-metanol-água (94 + 4,5 + 1,5)	Clorofórmio-acetona (9 + 1)
Ocratoxina A	Tolueno-acetato de etila- ácido fórmico (60+30+10)	Clorofórmio-acetona (9 + 1)
Esterigmatocistina	Clorofórmio-metanol (98+2)	Tolueno-acetato de etila-ác. fórmico (6 + 3 + 1)
Zearalenona	Éter etílico-ciclohexano (75 + 25)	Clorofórmio-etanol (95 + 5)
T-2	Clorofórmio-isopropanol- acetato de etila (95+5+5)	Tolueno-acetato de etila-ác. fórmico (60 + 30 + 10)
Triagem	Clorofórmio-acetona (9 + 1)	Tolueno-acetato de etila-ác. fórmico (6 + 3 + 1)

Tabela 13

Recuperação e limite de detecção relatados em métodos para análise múltipla de micotoxinas.

Referências	Ocratoxina A		Zearalenona		Esterigmatocistina		Aflatoxina B ₁	
	lim. µg/kg	% Rec.	lim. µg/kg	% Rec.	lim. µg/kg	% Rec.	lim. µg/kg	% Rec.
Wilson <i>et al.</i> (1976)	20- 40	50	200- 300	80	--	--	2	90
Gimeno (1979)	140- 145	92- 95	410- 510	150	--	--	4- 5	95
Miguel e De Andres (1982)	70	91	150	89	--	--	2- 3	84- 93
Nowotny <i>et al.</i> (1983)	50	50- 65	1000	60- 80	400	50- 70	5	80- 90
Thomas <i>et al.</i> (1975)	--	--	100	83- 100	--	--	2	28- 100
Josefsson e Moiler (1977)	10	117	35	100	10	100	5	106
Roberts <i>et al.</i> (1981)	20	95	--	--	--	--	1	95
Stoloff <i>et al.</i> (1971)	45- 90	--	200- 500	--	60	--	20	--
Takeda <i>et al.</i> (1979)	40- 60	30- 97	300- 500	70- 91	40- 60	30- 98	10	88- 99
Balzer <i>et al.</i> (1978)	40	87	200	85	--	--	2	71
Roberts e Patterson (1975)	80	50	1000	20- 25	330	30	3	60- 90
Le Tutour <i>et al.</i> (1984)	20	--	--	--	--	--	5- 7	--
Seitz e Mohr (1976)	--	--	200	--	--	--	5	--
Eppley (1968)	55	--	500	--	--	--	32	--

variação de 20% (Pohland et al., 1979). Com amostras reais contendo aflatoxinas, coeficientes de variação de estudos colaborativos publicados estão na faixa de 15 a 70%, com uma média em 30% (Nesheim, 1979).

A American Oil Chemical Society através do programa Smalley Check Sample, no período de 1976 a 1979, obteve dentre os resultados aceitáveis, provenientes em média de 35 laboratórios, um coeficiente de variação de 55% para amostras de amendoim, algodão e farinha de milho para um nível de aflatoxina de cerca de 40 µg/kg. Neste programa amostras com teor conhecido de aflatoxina são distribuídas para os laboratórios que as requisitam. O método de análise é da escolha do laboratório que vai executar a análise, podendo incluir instrumentação ou não (Horwitz et al., 1980).

Dados internacionais nos vem do International Agency for Research on Cancer (I.A.R.C.) sediada em Lyon, França. Esta instituição dá a oportunidade a qualquer laboratório no mundo, de verificar sua capacidade analisando uma amostra de teor conhecido de aflatoxina ou ocratoxina A preparado na própria I.A.R.C. Para aflatoxina B₁, os coeficientes de variação e os resultados médios dos 139 laboratórios envolvidos, localizados em 34 países, foram 77% e 13,95 µg/kg para uma amostra de milho branco, 66% e 6,45 µg/kg para uma amostra de pasta de amendoim e 85% e 4,51 µg/kg para outra amostra de pasta de amendoim. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com ou sem instrumentação (Friesen et al., 1980). Também para aflatoxina B₁, em amostras de torta de milho, torta de amendoim desengordurada e torta de amendoim crua, os coeficientes de variação intra e inter-laboratoriais foram de 10 - 20% e 139 a 144% respectivamente para 121 laboratórios em 31 países (Friesen e Garren, 1982).

Em uma outra verificação, desta vez para ocratoxina A, laboratórios de 24 países, compreendendo ao todo 44, chegaram a coeficientes de variação inter e intra-laboratoriais de 8,9% e 65,5% para o método da A.O.A.C. e de 8,0% e 82,1% para outros métodos (Friesen e Garren, 1983).

Nos programas de verificação da qualidade mencionados acima, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com ou sem instrumentação, tanto com relação a acuidade como repetibilidade. Representativo da importância de tais programas é o nível de eficiência alcançado pelo Ministério da Agricultura dos E.U.A. (U.S.D.A.) que mantém um programa de qualidade analítica para os 22 laboratórios do seu "Food Safety and Quality Service". Num série de análises anuais, durante um período de 5 anos, eles mantiveram um coeficiente de variação de 32% entre os laboratórios e 23% para os resultados intra-laboratoriais para um nível de 30 µg/kg de aflatoxina em torta de amendoim (Horwitz et al., 1980).

2.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Outros Métodos

Os métodos publicados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), incluem normalmente uma limpeza mais estrita e fracionamento das micotoxinas presentes no extrato para injeção em separado no cromatógrafo. As condições são diferentes em termos das fases móvel e estacionária para cada micotoxina. Tipicamente a limpeza do extrato pode incluir fracionamento em coluna de sílica gel e/ou partições utilizando um número de solventes, com ou sem um desengorduramento prévio com um hidrocarboneto (Moller e Josefsson, 1978; Hunt et al., 1978; Ware e Thorpe, 1978; Kmiecik, 1976; Hurst et al., 1982; Pons e Franz, 1977; Pons e Franz, 1978; Awe e Schranz, 1981; De Vries e Chang, 1982; Schweighardt et al.,

1980; Josefsson e Moller, 1979; Scott et al., 1978; Francis et al., 1982; Tarter et al., 1984). Também fracionamento por partições sucessivas para meios com diferentes graus de acidez e basicidade, diálise, filtração em gel ou Sep-Pak são utilizados sozinhos ou como um conjunto de etapas (Trenholm et al., 1984; Cohen e Lapointe, 1980; Holder et al., 1977; Thean et al., 1980; Osborne, 1979; Schmidt et al., 1981; Stack et al., 1976; Howell e Taylor, 1981; Knutti et al., 1979). Menos freqüentemente sistemas de clarificação por precipitação com sais (De Vries e Chang, 1982; Pons, 1979; Nowotny et al., 1983c), ou derivação com ácido trifluoroacético, prévia à injeção no cromatógrafo (Cohen e Lapointe, 1984; Haghghi et al., 1981) são encontrados em adição ou não aos procedimentos mais usuais de limpeza.

A fase reversa, geralmente octadecilsilil, tem aparecido mais como fase estacionária enquanto a fase normal de sílica gel um pouco menos. Mais raramente encontramos alumina e derivado aminado. O detetor de fluorescência tem sido o mais empregado, as vezes em série com o detetor ultra-violeta/visível.

Uma maneira elegante de realizar a confirmação que vem se tornando cada vez mais difundida é obter cromatogramas da amostra com o detetor primeiro em um comprimento de onda depois em outro. Uma razão é então calculada entre as áreas ou alturas do pico suspeito nos dois cromatogramas. Uma razão entre áreas ou alturas é calculada para o padrão nos mesmos comprimentos de onda. A razão calculada para o composto na amostra e a razão calculada para o padrão devem coincidir. Alguns autores admitem uma diferença de até 5% entre as duas, outros admitem até 10%. Se o processo for repetido envolvendo outro comprimento de onda, teremos 3 razões entre áreas ou alturas para o composto sendo examinado e 3 para o padrão. Tanto o detetor de ultra-violeta visível como o de fluorescência po

dem ser empregados (Trenholm et al., 1984; Cohen e Lapointe, 1980; Josefsson e Moller, 1979; Howell e Taylor, 1981).

A confirmação pode ser também executada verificando os cromatogramas da amostra presuntiva positiva e do padrão antes e depois de uma reação de derivação. O tempo de retenção do derivado deve ser diferente mas, da mesma maneira que em camada delgada, o comportamento do padrão e do composto suspeito deve coincidir tanto antes como depois da derivação (Pons e Franz, 1979; Awe e Achranz, 1981; Thean et al., 1980; Tarter et al., 1984; Davis e Diener, 1980).

A colocação de um detetor de fluorescência em série com um de U.V./visível simplifica grandemente a confirmação pois é suficiente a simples verificação da coincidência do tempo de retenção do padrão e do pico em estudo nos dois cromatogramas produzidos simultaneamente pelos detetores (Knutti et al., 1979; Osborne, 1979).

Os métodos propostos para ocratoxina A em CLAE, tem sido relatados com limites de detecção de 0,5 a 12,5 $\mu\text{g/kg}$ (Schweighardt et al., 1980; Phillips et al., 1983; Hunt et al., 1978; Josefsson e Moller, 1979; Nowotny et al., 1983c; Osborne, 1979), recuperações que vão de 33-90% e repetibilidade de 10-24%. Para aflatoxinas apresentam limites de detecção para aflatoxina B₁ de 0,2 a 2,5 $\mu\text{g/kg}$ e caem nas seguintes faixas para recuperação de 64-118% e repetibilidade de 4,9-27% (Hunt et al., 1978; Haghghi et al., 1981; De Vries e Chang, 1982; Tarter et al., 1984; Knutti et al., 1979; Cohen e Lapointe, 1981; Pons e Franz, 1979; Pons, 1974; Pons e Franz, 1977; Thean et al., 1980; Hurst et al., 1982; Awe e Schranz, 1981).

Esterigmatocistina raramente tem sido alvo de trabalhos com CLAE. Numa das poucas publicações envolvendo esta micotoxina, Stack et al. (1976) relatam uma recuperação de 59-74% e uma repeti-

bilidade de 8,4 a 12% e omitem o limite de detecção.

Após alguns métodos terem sido desenvolvidos para zearale nona por CLAE (Ware e Thorpe, 1978, Holder et al., 1977; Chang e De Vries, 1984; Cohen e Lapointe, 1980; Moller e Josefsson, 1978; Trenholm et al., 1984), um estudo colaborativo foi realizado na U.S.D.A. envolvendo 13 analistas e utilizando amostras de milho. A recuperação média foi de 77,8 a 123% e os coeficientes de variação de 25,6% para amostras artificiais e 47% para amostras naturalmente contaminadas. O limite de detecção obtida foi de 50 µg/kg (Bennett et al., 1985).

A separação, por CLAE, de várias micotoxinas presentes no mesmo extrato, foi tentada com padrões por Engstrom et al. (1977). Este grupo conseguiu separar aflatoxina B₁, aflatoxina G₁, ocratoxina A, zearalenona, rubratoxina B, patulina e ácido penicílico em uma coluna de fase reversa, tendo como fase móvel, acetonitrilo-água-ácido acético (55 + 45 + 2) ou (45 + 55 + 2).

Métodos que utilizam técnicas imunológicas tem atraído atenção recentemente. As técnicas de RIA (RadioImunoAssay) e ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) foram aplicadas a partir de 1976 para micotoxinas em alimentos (Pohland et al., 1981). Uma comparação entre os dois métodos foi realizada por Chu (1984) e mostra que ELISA apresenta maior sensibilidade (Tabela 13) principalmente no caso de aflatoxina M₁.

A simplicidade de execução de análise e potencial para automação são os pontos fortes neste tipo de metodologia. Porém, técnicas imunológicas são extremamente caras de desenvolver e devem ser rigorosamente testadas para a possibilidade de reação cruzada com outros compostos (Pohland et al., 1981). A recuperação neste tipo de método pode atingir 60% e o coeficiente de variação entre du-

Tabela 14

Límites de detecção das técnicas RIA e ELISA (Chu, 1984).

Toxina	Límites de detecção (µg/kg)	
	RIA	ELISA
Aflatoxina B ₁	5,8	3
Aflatoxina M ₁	5	0,25
Toxina T-2	1,0	2,5
Ocratoxina A	--	1 - 2
Zearalenona	5	--

plicatas, 9 a 30% (Chu, 1984). Uma outra desvantagem está no fato que é necessário desenvolver um anticorpo diferente para cada tipo de aflatoxina, isto é, o teste para B₁ não serve para B₂ ou G₁ ou G₂.

Um procedimento utilizando espectrofotômetro foi criado por Hult e Gatenbeck (1976). Nesse método a ocratoxina A é partida por ação da carboxipeptidase em fenilalanina e ocratoxina α . A ocratoxina A tem um pico de fluorescência a 380 nm e a ocratoxina α a 340 nm.

A queda de fluorescência a 380 nm é utilizada como medida do teor de ocratoxina A. Os autores afirmam ser possível a detecção de 4 $\mu\text{g/kg}$ em cevada. O método foi estendido para sangue de porco (Hult et al., 1979).

Finalmente, a cromatografia gasosa tem sido empregada com sucesso no caso de tricotecenos e da zearalenona. As toxinas do Fusarium spp. tem sido identificadas e quantificadas por cromatografia gasosa sob a forma de derivados de trimetilsilil (Mirocha et al., 1974; Scott et al., 1978; Kamimura et al., 1981; Richardson et al., 1985; Collins e Rosen, 1979) numa variedade de substratos. Alguns outros autores preferem a formação de outro tipo de derivados como é o caso de Holder et al. (1977) que empregam derivados de pentafluoropropionil, Romer et al. (1978) que utilizam esteres de diheptafluorobutil e Scott et al. (1981) que favorecem tris-heptafluorobutiratos. A confirmação por todos os autores mencionados é realizada com espectrometros de massa.

Os limites de detecção obtidos variam. Uma sensibilidade algo melhor em alguns casos é conseguida com captura de elétrons em comparação com a alcançada com ionização de chama. Para T-2, deoxinivalenol e diacetoxiscirpenol, os limites de detecção relatados na

literatura para ionização de chama são de 30-1000 µg/kg, 70-100 µg/kg e 10-400 µg/kg respectivamente. Para captura de elétrons entre limites são 80-100 µg/kg, 2-15 µg/kg e 80 µg/kg (Scott, 1982).

Os levantamentos que vem sendo realizados tem empregado consistentemente camada delgada. Mais recentemente com o desenvolvimento de métodos em cromatografia gasosa e CLAE para micotoxinas específicas, existe a opção de quantificação de amostras positivas por essas vias instrumentais. Um exemplo é o trabalho com milho proveniente de 111 fazendas na Austrália, onde Blaney et al. (1984) utilizaram camada delgada para triagem de aflatoxinas, ocratoxina A, toxina T-2, esterigmatocistina e zearalenona. As amostras contendo zearalenona foram quantificadas por CLAE.

A importância de camada delgada, porém, pode ser bem apreciada através das palavras de Stoloff (1983) no seu relatório anual como coordenador da comissão da A.O.A.C. encarregada da avaliação da confiabilidade de métodos e estudos na área de micotoxinas: "quanto mais equipamentos esotéricos e caros forem requeridos para análises, menos laboratórios possuirão capacitação analítica, menos análises serão executadas e menor será a base de dados para tomada de decisões. A simplicidade e baixo custo da camada delgada não pode ser levianamente abandonada por outras ferramentas da ciência de separação, mais glamurosas e caras. As melhorias prometidas em precisão derivadas do uso de mais instrumentação não se materializaram nas comparações realizadas entre laboratórios".

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Avaliação dos Métodos Existentes

Foram avaliados métodos para determinação simultânea de micotoxinas já publicados (Takeda et al., 1979; Eppley, 1968; Balzer et al., 1978), em termos de sua aplicabilidade em laboratórios nacionais e sem deixar de lado requisitos essenciais como precisão e acuidade. O perfil desses métodos pode ser apreciado na Tabela 9.

3.2. Desenvolvimento de Novos Métodos

3.2.1. Preparo de Amostras Artificialmente Contaminadas

Amostras artificialmente contaminadas foram preparadas com fubá amarelo, amendoim cru, feijão preto cru, arroz polido cru ou farinha de mandioca. Tanto amendoim como feijão e arroz foram triturados num moinho tipo Wyllie munido de peneira de 20 mesh.

Partindo de 50 g de um dos alimentos acima, foram acrescentados tantos microlitros da solução padrão da micotoxina quanto necessário para atingir o nível de contaminação desejado. O padrão foi gotejado em diferentes pontos no centro da superfície superior da massa da amostra. Nenhuma homogeneização foi feita para evitar que a solução padrão aderisse às paredes do recipiente. Foi permitido ao solvente da solução padrão evaporar naturalmente durante a noite, após o que a amostra adicionada de micotoxina estava pronta para extração.

3.2.2. Teste com Solventes para Extração

Os seguintes solventes foram testados: (1) acetona/água (85+15), (2) metanol, (3) metanol alcalino (pH 9-10), (4) metanol/água (1+1), (5) metanol/KCl 4%/H₂SO₄ 20% (178+20+2), (6) metanol/KCl 4% (9+1) e (7) metanol/H₂SO₄ 20% (99+1).

Cada amostra de 50g de milho moído foi artificialmente contaminada com ocratoxina A, conforme o procedimento descrito em 3.2.1. Após transferência de uma dessas amostras para o copo do liquidificador, foram acrescentados 270 mL do solvente sendo testado. Após 5 minutos de homogeneização a mistura foi filtrada em funil de papel de filtro qualitativo pregueado.

Uma alíquota de 150 mL foi transferida para um bquer de 600 mL onde foram adicionados 150 mL de (NH₄)₂SO₄ a 30% e 50 mL de celite. Após filtração em papel pregueado qualitativo, 150 mL do extrato foram passados para um funil de separação, onde 150 mL de água foram previamente colocados. Duas extrações com 10 mL de clorofórmio foram realizadas. De cada extração, 3 mL foram retirados e reunidos em um frasco pequeno de vidro ambar. O extrato foi levado à secura em banho-maria e redissolvido em 200 µL benzeno/acetonitrilo (98+2).

A quantificação foi realizada como descrito em 3.3. O valor encontrado foi então dividido pelo valor da adição de ocratoxina A (200 µg/kg) para obtenção da recuperação.

3.2.3. Teste de Clarificantes para Limpeza de Extratos

Seguindo o procedimento descrito em 3.2.2. e utilizando metanol/4% KCl (9+1), como solvente de extração, o desempenho dos

seguintes clarificantes foi avaliado: (1) cloreto férrico, (2) carbonato básico de cobre, (3) cloreto férrico em combinação com carbonato básico de cobre, (4) sulfato cúprico e (5) sulfato de amônio.

3.2.4. Teste de Solventes para Desenvolvimento Simultâneo de Ocratoxina A, Zearalenona, Esterigmatocistina e Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em Camada Delgada

Foram avaliados os seguintes solventes com relação a separação e a resolução das micotoxinas em questão: (1) clorofórmio/metanol/água/ácido fórmico (90+10+1+1), (2) benzeno/metanol/ácido acético (90+5+5), (3) acetato de etila/n-hexano (3+1), (4) tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (5+4+1), (5) benzeno/acetato de etila/ácido fórmico (80+20+0,5), (6) tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (60+40+0,5), (7) tolueno/acetato de etila/clorofórmio/ácido fórmico (70+50+50+20), (8) clorofórmio/metanol (95+5), (9) clorofórmio/acetona/propanol (85+10+15), (10) clorofórmio/acetona/isopropanol (95+5+5), (11) clorofórmio/acetona/água (88+12+1,5), (12) éter etílico/metanol/água (96+3+1), (13) clorofórmio/acetona/isopropanol (88+12+1,5+1), (14) clorofórmio/isopropanol (99+1).

3.2.5. Desenvolvimento da Minicoluna para Ocratoxina A

Os seguintes adsorventes foram testados como recheio para minicoluna: (1) florisil, (2) alumina/sílica gel/florisil, (3) sílica gel/florisil, (4) sílica gel/alumina, (5) alumina/florisil.

Cada tipo de minicoluna foi avaliada com três solventes diferentes. Em cada uma destas avaliações, 0,5 µg de ocratoxina A dissolvidos em 2 mL de clorofórmio foram aplicados à minicoluna. Em seguida, a minicoluna foi desenvolvida com 5 mL de clorofórmio/ace-

tona (9+1), metanol ou tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (5+4+1).

Em consequência destes testes, foi escolhido um tipo de minicoluna como mais promissor. Nesse tipo foram aplicados 2 mL de extrato de milho obtidos como descrito em 3.2.6 e adicionados de 0,5 µg de ocratoxina A, para verificação de possíveis interferentes provenientes do alimento. Foram testados os seguintes solventes de desenvolvimento para escolha do mais adequado: (1) metanol, (2) tolueno/acetato de etila/ácido acético (50+49+1), (3) idem (50+48+2), (4) idem (59+47+3) e (5) tolueno/acetato de etila (1+1).

Com a minicoluna e o solvente para desenvolvimento estabelecidos, o sistema completo foi testado com extratos de outros alimentos de interesse: feijão, mandioca, amendoim e arroz.

3.2.6. Método para Triagem e Quantificação de Ocratoxina A

No copo do liquidificador foram colocados 50 g de amostra, 270 mL de metanol e 30 mL KCl 4%. Em velocidade baixa, foram misturados por 5 minutos e a seguir filtrados em papel de filtro qualitativo sanfonado.

Uma alíquota de 150 mL do filtrado foi adicionada a 150 mL do clarificante (sulfato de amônia 30% para milho, mandioca e arroz e sulfato de cobre 10% para feijão, amendoim e arroz) e 50 mL de celite ou equivalente medido em um béquer. A mistura foi homogeneizada com bastão de vidro e filtrada em papel de filtro qualitativo sanfonado.

Uma alíquota de 150 mL dessa segunda filtração foi transferida para um funil de separação, onde 150 mL de água haviam sido previamente colocados. Duas partições para 10 mL de clorofórmio com

um tempo de agitação de 3 minutos foram levadas a cabo. Do primeiro extrato clorofórmico foram retirados 2 mL para triagem em minicoluna (Figura 6).

Na minicoluna, medindo cerca de 6 mm de diâmetro interno e cerca de 20 cm de comprimento, com um colo de 6 cm após uma redução para 2 mm de diâmetro interno, foi colocado no fundo um pequeno chumaço de lã de vidro. Os materiais de recheio foram deixados cair por gravidade, batendo ocasionalmente no balcão. A seguinte ordem e altura foi seguida para cada sólido: 5 mm de sulfato de cálcio (20-40 mesh), 10 mm de alumina neutra, 20 mm de sílica gel (70-230 mesh) e 5 mm de sulfato de cálcio (20-40 mesh) (Figura 7).

Através da minicoluna assim construída foram deixados escoar 2 mL do extrato clorofórmico obtido na primeira partição. Em seguida, foram aplicados 4 mL tolueno/acetato de etila/ácido acético (50+49+1) para desenvolvimento. A minicoluna foi observada sob luz ultra-violeta de ondas longas (366 nm) e a presença de ocratoxina A foi indicada por uma banda fluorescente azul na interface sílica gel/alumina. Colunas de referência foram preparadas dissolvendo padrão de ocratoxina A em 2 mL de clorofórmio e deixando escoar pela coluna, seguidos do solvente de desenvolvimento. As minicolunas com resultados positivos, indicaram a necessidade de proceder à confirmação e quantificação. Para confirmação foi seguido o procedimento descrito em 3.4. Para quantificação foram tomados 3 mL de cada extrato clorofórmico, reunidos em um pequeno frasco ambar e submetidos a secagem em banho-maria (Figura 8). Foi seguindo o método descrito em 3.3, utilizando como solvente para desenvolvimento para camada delgada tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (60+40+10).

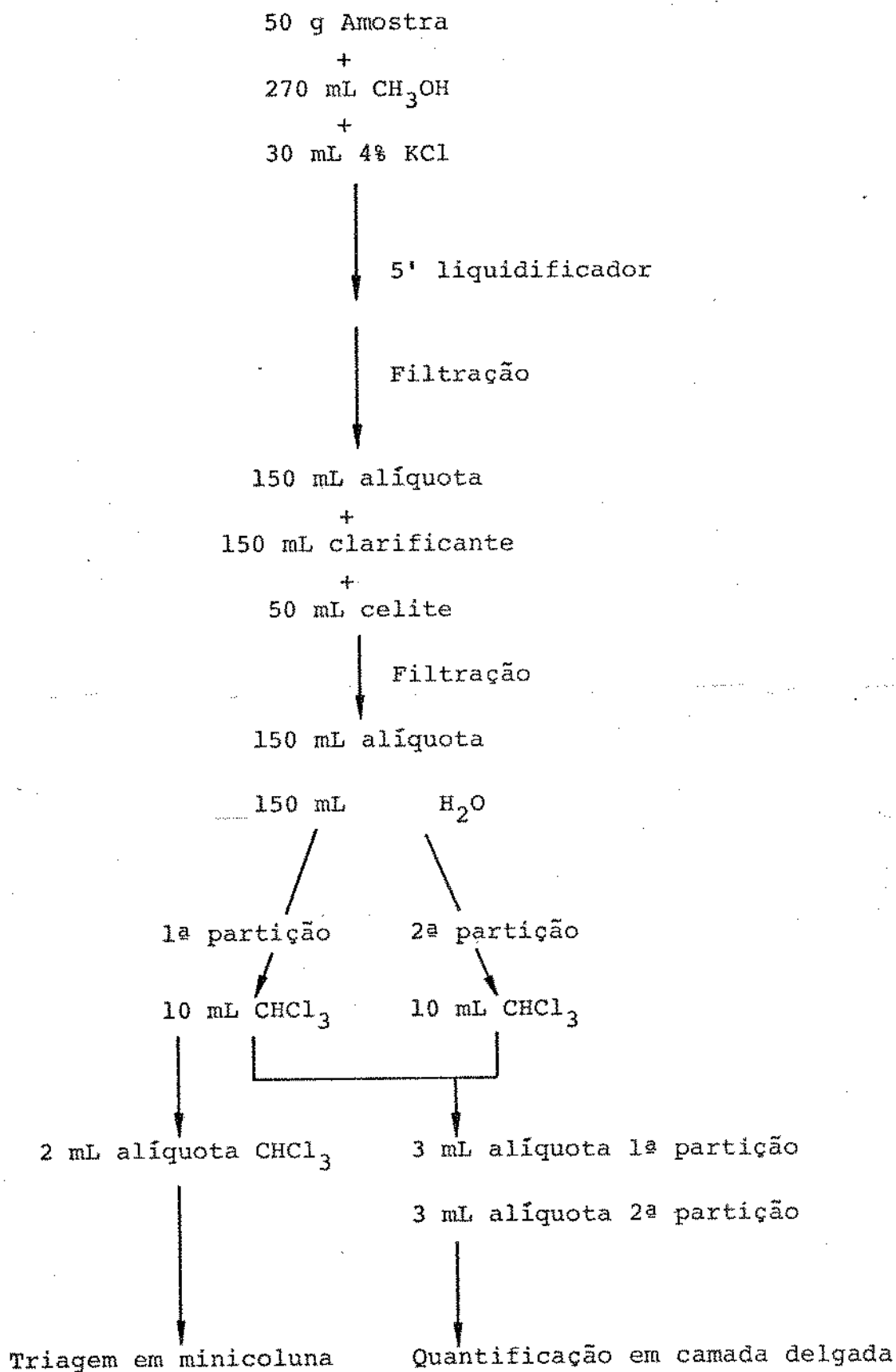


Figura 6 - Extração e limpeza para triagem e quantificação de ocratoxina A.

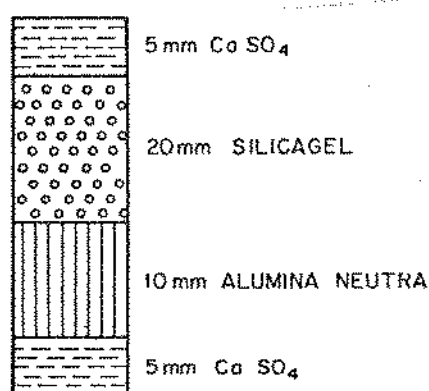


Figura 7 - Minicoluna proposta para ocratoxina A.
Desenvolvimento: clorofórmio seguido
de tolueno/acetato de etila/ácido acé-
tico (50+49+1).

3 mL 1ª partição CHCl_3

+

3 mL 2ª partição CHCl_3



banho-maria

N_2

200 μL Benzeno



Camada delgada

Sílica gel 60 G

Tolueno/Acetato de Etila/Ácido Fórmico
(50+40+10)



U.V. 366 nm

Figura 8 - Quantificação da Ocratoxina A.

3.2.7. Método para Análise Simultânea de Ocratoxina A, Zearalenona, Esterigmatocistina e Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

Foi seguido o procedimento descrito em 3.2.6 até "Duas partições para 10 mL clorofórmio com um tempo de agitação de 3 minutos foram levadas a cabo". Neste ponto foram recolhidos 5 mL de cada partição, reunidos em um pequeno frasco ambar e submetidos a secagem em banho-maria (Figura 9). Para quantificação e verificação da presença das micotoxinas (Figura 10) foi dado prosseguimento como descrito em 3.3 e para confirmação dos resultados, como em 3.4.

3.3. Quantificação

A quantificação foi realizada por cromatografia em camada delgada através de comparação visual com padrões. Placas de sílica gel 60 G com 0,25 mm de espessura foram preparadas no laboratório e aquecidas por 1 hora a 80°C. O aquecimento torna-se desnecessário em climas secos.

Os extratos secos foram redissolvidos em 200 µL ou outro volume conveniente de benzeno. Uma agitação em banho de ultra-som por 30 segundos foi empregada para garantir solubilização. Um outro sistema igualmente eficiente de agitação do extrato pode ser empregado no lugar de ultra-som.

Para verificar a presença de micotoxinas e poder realizar simultaneamente a quantificação quando fosse o caso, foram aplicados na placa 5 µL de cada extrato duas vezes. Sobre a segunda mancha de extrato foi aplicada uma quantidade adequada de padrão. Na mesma placa foram aplicados 1,2,3,4 e 5 µL de cada padrão de micotoxina. A placa foi desenvolvida em tolueno/acetato de etila/ácido

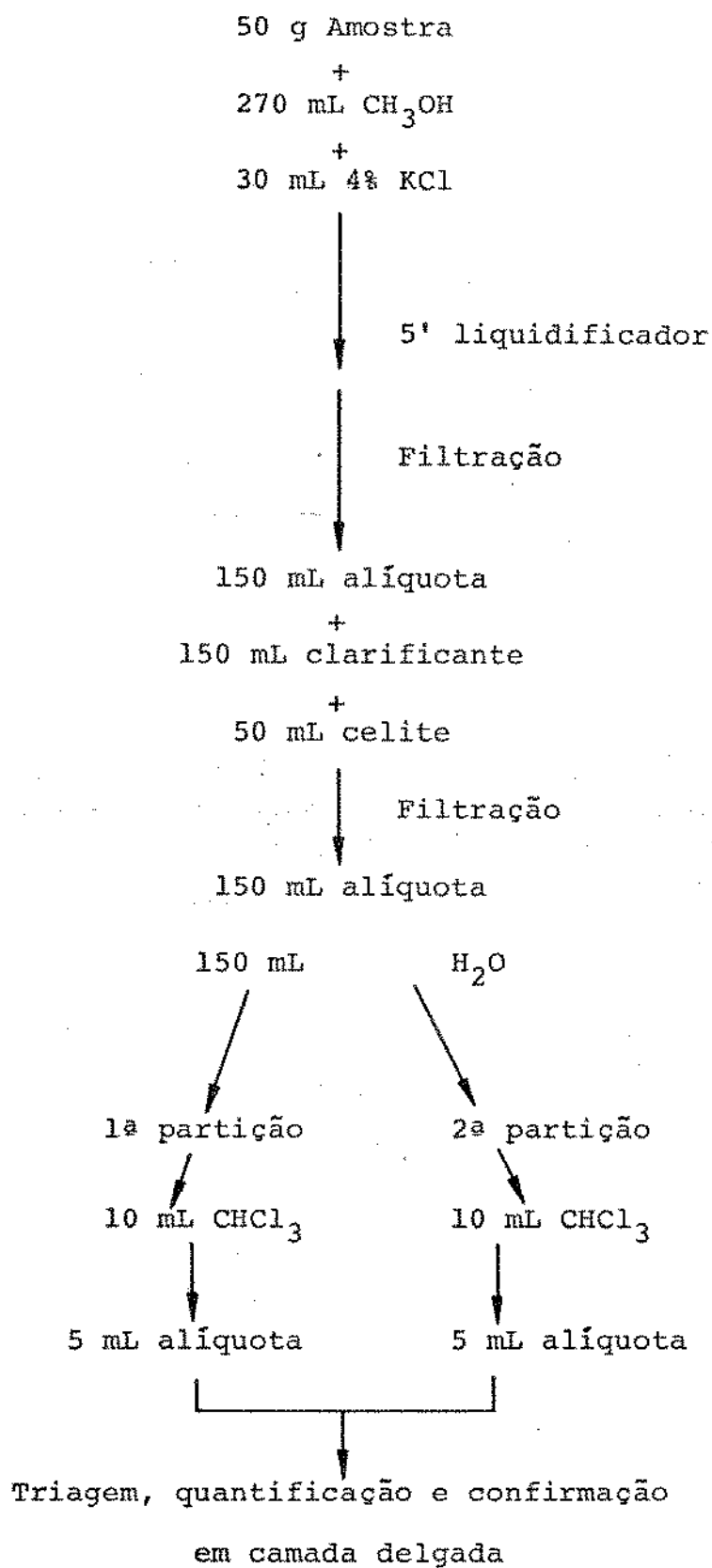


Figura 9 - Extração e limpeza para análise simultânea de ocratoxina A, zearalenona, esterigmatocistina e aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

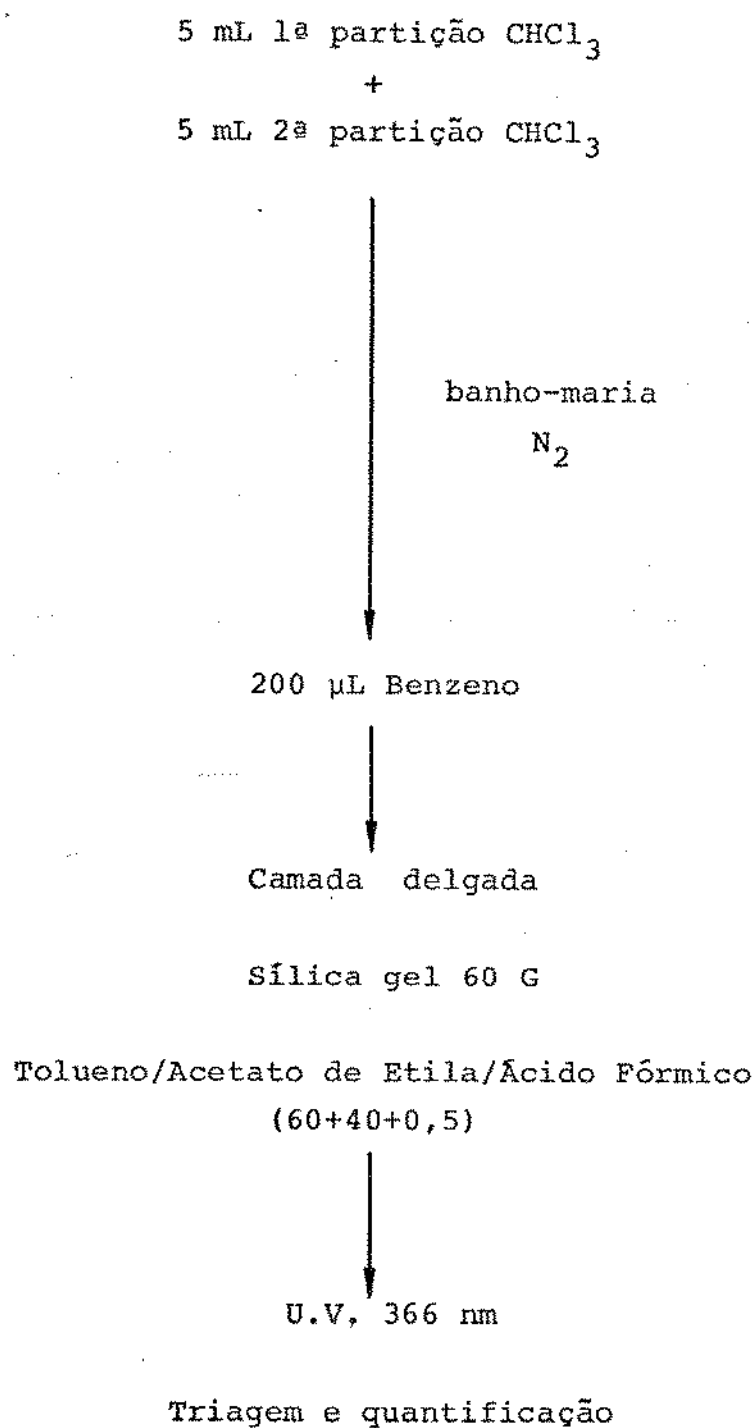


Figura 10- Triagem e quantificação simultâneas de ochratoxina A, zearalenona, esterigmatocistina e aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 .

fórmico (60+40+0,5) e deixada secar naturalmente ao ar. Sob luz ultra-violeta de ondas longas (366 nm) a placa foi inspecionada na procura de manchas fluorescentes indicativas da presença de aflatoxinas e ocratoxina A. A seguir a placa foi nebulizada com solução de cloreto de alumínio 20% em etanol a 75% e aquecida a 110°C por 5 minutos. A placa ainda morna foi colocada novamente sob luz ultra-violeta desta vez na procura de zearalenona e esterigmatocistina. Manchas fluorescentes com o mesmo Rf e tonalidade do padrão, inclusive na co-cromatografia, foram consideradas resultados positivos presuntivos e a quantificação foi efetuada por comparação visual da intensidade de fluorescência da mancha suspeita com as dos padrões.

Sempre que necessário uma nova placa foi aplicada e desenvolvida com uma diluição da amostra ou uma concentração da solução padrão diferente das anteriores para obtenção de uma melhor aproximação da intensidade de fluorescência entre a mancha suspeita e as manchas dos padrões.

3.4. Confirmação

Os extratos das amostras presuntivas positivas foram re-aplicados em duas outras placas e essas desenvolvidas em dois sistemas solventes diferentes do inicial (Tabela 15).

Para aflatoxinas, especificamente, a mesma placa onde foi realizada a quantificação, pode ser submetida a um segundo desenvolvimento em éter etílico. Este procedimento elimina praticamente a possibilidade de um falso positivo mas não elimina a obrigatoriedade da confirmação por derivação química ou por espectrometria de massa.

Tabela 15.

Solventes utilizados para desenvolvimento de micotoxinas em camada delgada de sílica gel 60 G.

Toxinas	Solvente
Aflatoxinas	
Ocratoxina A	Tolueno-Acetato de Etila-Ácido Fórmico (60+40+0,5) (Este trabalho)
Zearalenona	
Esterigmatocistina	
Ocratoxina A	(1) Tolueno-Acetato de Etila-Ácido Fórmico (5+4+1) (A.O.A.C., 1984) (2) Hexano-Acetona-Ácido Acético (18+2+1) (A.O.A.C., 1984) (3) Éter Etilico-Ciclohexano-Acetato de Etila - Ácido Fórmico (75+20+5+2) (Gimeno, 1980)
Zearalenona	(1) Tolueno-Acetato de Etila-Clorofórmio-Ácido Fórmico (35+25+25+10) (Gimeno, 1980) (2) Benzeno-Metanol-Ácido Acético (90+5+5) (A.O.A.C., 1984)
Esterigmatocistina	(1) Tolueno-Acetato de Etila-Clorofórmio-Ácido Fórmico (35+25+25+10) (Gimeno, 1980) (2) Benzeno-Metanol-Ácido Acético (90+5+5) (A.O.A.C., 1984)
Aflatoxinas	(1) Clorofórmio-Acetona (9+1) (A.O.A.C., 1984)
B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	(2) Benzeno-Metanol-Ácido Acético (90+5+5) (A.O.A.C., 1984) (3) Clorofórmio-Acetona-Isopropanol-H ₂ O (88+12+1,5+1) (A.O.A.C., 1984)

Para derivação química de cada micotoxina, os procedimentos descritos no A.O.A.C. (1984) para aflatoxinas, zearalenona e esterigmatocistina foram seguidos. Para ocratoxina A, a derivação proposta por Hunt et al. (1980) foi considerada mais apropriada devido a sua facilidade de execução.

3.5. Levantamento: Amostragem e Preparo das Amostras

A aquisição de amostras foi realizada ao acaso em vários pontos do comércio varejista, tais como mercados e supermercados, grandes e pequenos. Para grãos, tais como feijão, arroz e milho para canjica e pipoca, foram adquiridas amostras de 5 kg, para garantir maior representatividade. Tal cuidado foi tomado devido a heterogeneidade da contaminação por micotoxinas (Campbell, 1979; Whitaker et al., 1979; Whitaker e Whitten, 1976; Cucullu et al., 1966). No caso de alimentos processados, foram tomadas amostras de 1 kg, já que o próprio processamento dá origem a produtos mais homogêneos.

As amostras de grãos foram individualmente moídas até atingirem uma granulometria de 20 mesh e cada uma misturada e revolvida antes da retirada da amostra analítica (50 g cada duplicata).

As amostras de milho em conserva, constituídas de 5 latas de 200 g cada, foram abertas e escorridas e os grãos moídos em um moedor de carne elétrico. Após moagem, cada amostra foi também revolvida para subsequente retirada da amostra analítica.

As amostras de outros alimentos processados tais como fu bá, farinha de mandioca, farinha de milho e sêmola de milho, foram individualmente misturadas antes da retirada da amostra para análise.

3.6. Comparação com Outras Metodologias

Com relação a aflatoxinas, as primeiras 117 amostras do levantamento foram analisadas também pelo método de Romer, por L. Venturelli, técnica do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição (DEPAN, FEA). Uma dentre as amostras identificadas como contaminadas, foi quantificada com várias repetições pelo método de Romer, no DEPAN, e pelo método proposto no nosso laboratório.

Para zearalenona, foi efetuada uma comparação entre o método proposto e o método da A.O.A.C. (1984), utilizando três amostras de milho contaminado cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. As referidas amostras foram analisadas simultaneamente, no nosso laboratório, pelo método proposto e por Mirna Sabino, na referida instituição, pelo método da A.O.A.C. modificado, onde a etapa de limpeza com coluna de sílica gel foi substituída por desengorduramento com n-hexano.

3.7. Testes Preliminares com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Foi utilizado um cromatógrafo líquido LDC, composto de Gradient Master 1601, bomba Constametric I, bomba Constametric II, integrador modelo 308, registrador modelo 3402 e detetor ultravioleta/visível, modelo 1202. Uma coluna de 25 cm, LiChrosorb Si 60 (10 μ m), acompanhada de uma coluna de guarda de 5 cm, empacotada com sílica gel Sil-X-1 (35 μ m) foi empregada. Os testes foram conduzidos inicialmente com padrões e posteriormente com extratos de milho artificialmente contaminados obtidos como descrito em 3.5.6.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Aplicabilidade de Métodos Existentes

Numa primeira etapa foram escolhidos alguns métodos na literatura para uma avaliação de sua utilidade em nossas condições de trabalho. O primeiro destes métodos a ser testado foi o de Takeda et al. (1979) devido aos limites de detecção relatados serem baixos e, portanto, atraentes. Durante o seu emprego ficou evidente que os limites de detecção mencionados pelos autores na realidade referiam-se aos padrões puros aplicados na camada delgada e não aos extratos de alimentos contaminados que mostraram-se bem mais elevados.

A metodologia descrita por Eppley (1968), por sua vez, foi incluída por tratar-se da origem de uma série de outros métodos que diferem entre si apenas por pequenos detalhes sem maiores consequências. Por outro lado, todo este corpo de métodos derivados do trabalho de Eppley, constitui a maior parte dos procedimentos encontrados na literatura, o que despertou o nosso interesse pelo trabalho original. Todos tem em comum uma extração da amostra por um solvente caro e tóxico do tipo acetonitrilo ou clorofórmio, seguida por fracionamento em coluna de sílica gel onde grandes volumes de solventes também caros e tóxicos são empregados.

O procedimento proposto por Balzer et al. (1978) foi incluído por constar, em sua etapa de limpeza do extrato, de uma série de partições para solventes de graus de acidez e basicidade diferentes.

Os métodos mencionados, além de laboriosos e caros, produziram extratos que ao serem desenvolvidos em camada delgada, mos-

travam-se carregados de interferentes e com uma faixa de impurezas do ponto de aplicação à frente de solvente. Tal situação é altamente indesejável para identificação e quantificação seguras. Além disso, o método de Balzer *et al.* (1978) não pode ser executado de maneira quantitativa por ocorrer miscibilidade entre os solventes na segunda partição da primeira etapa de limpeza. Estes resultados apenas confirmaram na prática o que o exame da literatura disponível já nos havia alertado: a ausência de uma metodologia rápida e econômica com sensibilidade adequada. Tornou-se clara a necessidade do desenvolvimento de um procedimento que preenchesse estes requisitos. Antes de iniciar tal trabalho, o método de Romer (1975) para aflatoxinas foi testado para ocratoxina A e esterigmatocistina. Destas, no entanto, nada foi recuperado.

4.2. Metodologia Analítica Desenvolvida

4.2.1. Sistema de Extração e Limpeza para Grãos Contaminados com Ocratoxina A

Ocratoxina A foi escolhida para o trabalho de desenvolvimento de metodologia por ser mais polar que aflatoxinas, zearaleno ou esterigmatocistina e, portanto, requerendo condições mais extremas para extração completa e cuidados maiores durante a limpeza para evitar perdas. Foram estabelecidos como princípios norteadores do trabalho:

- a) Manter o menor número possível de etapas como uma maneira de reduzir as perdas e o tempo de análise.
- b) Utilizar um solvente seletivo para extração da amostra, capaz de extrair completamente a toxina e o mínimo de lípidos e interfe-

rentes, fluorescentes ou não.

- c) Realizar a limpeza do extrato com um clarificante adequado, devido ao seu baixo custo, eficiência e rapidez, em vez de utilizar cromatografia em sílica gel que provou ser ineficiente, ou cromatografia de exclusão de tamanho por seu alto custo, ou partições sucessivas, método laborioso e com poucas perspectivas.

Foi dado início ao trabalho examinando o comportamento de vários solventes (Tabela 16) e empregando o milho, artificialmente contaminado com ocratoxina A, por ser um dos alimentos de limpeza mais difícil.

A combinação acetona/água (85+15) foi empregada por Romer (1975) para extrair aflatoxinas de milho e rações. Metanol foi utilizado por Romer et al. (1978) para extrair diacetoxiscirpenol e toxina T-2 de milho, por Scott et al. (1978) para extrair zearalenona de milho, por Holder et al. (1977) para extrair zearalenona de rações, e por Seitz e Mohr (1976) para extrair aflatoxinas de milho. Metanol alcalino (pH 9-10) foi incluído por tratar-se ocratoxina A de um ácido. Metanol/água (1+1) vem a ser uma concentração próxima à empregada no método B.F. para aflatoxinas, A.O.A.C. (1984). Metanol/4% KCl/20% H_2SO_4 (178+20+2) foi inspirado no trabalho de Takeda et al. (1979) que utiliza acetonitrilo/4% KCl/20% H_2SO_4 (178+20+2). Acetonitrilo é tóxico e muito caro e foi substituído por metanol que possui um momento dipolar de 0,30 e índice de polaridade de 6,6, próximos portanto, do acetonitrilo com 0,41 e 6,2, respectivamente. Metanol/4% KCl (9+1), onde mais uma vez o metanol substitui o acetonitrilo, foi empregado no lugar de acetonitrilo/4% KCl (9+1) que é defendido por vários autores (Hunt et al., 1978; Stack et al., 1976; Roberts e Patherson, 1975; Schmidt et al., 1981; Stoloff et al., 1971). Por outro lado, Vesonder e Horn (1985) usaram metanol/4% KCl (9+1) para extrair esterigmatocistina de rações e Le Tutour

et al. (1984) utilizaram metanol/4% NaCl (9+1) para extrair ocratoxina A e aflatoxinas de azeitonas pretas. Metanol/H₂SO₄ (99+1) ocorreu-nos como um desdobramento natural das tentativas já descritas.

Na Tabela 16, torna-se evidente que a melhor recuperação é conseguida com metanol/4% KCl (9+1) e com metanol/H₂SO₄ 20%(99+1). O primeiro solvente foi escolhido para continuação dos testes com clarificantes, por tratar-se de um solvente neutro oferecendo melhores condições de conservação das micotoxinas no extrato.

O exame do desempenho dos clarificantes começou com aqueles utilizados por Romer (1975) na determinação de aflatoxinas, devido ao seu custo relativamente mais baixo e terem sido empregados em extratos de milho e rações (Tabela 17). Como os resultados não corresponderam às nossas expectativas, foi tentado o sulfato cúprico, por ser um sal neutro totalmente dissociável e pela convicção que o íon cúprico teria parte ativa no processo de clarificação. Realmente, os extratos obtidos mostraram-se límpidos e com 100% de recuperação. Esta ação do íon cúprico pode ser resultante de suas propriedades complexantes, independente ou não de causar precipitação durante a clarificação.

A tentativa com o sulfato de amônio foi inspirada em Scott et al. (1981) que o empregou para limpar extratos de trigo, cevada e milho para analisar deoxinivalenol por cromatografia gasosa/espectrometria de massa. Também Romer et al. (1978) o utilizaram na clarificação de extratos de milho e rações para análise de T-2 e diacetoxiscirpenol por cromatografia gasosa. A ocratoxina A exibiu total recuperação com sulfato de amônio que foi desta forma retido para testes mais detalhados.

Sulfato de amônio e sulfato cúprico foram então comparados avaliando o comportamento do extrato em camada delgada e em mi-

Tabela 16

Recuperação da ocratoxina A com diferentes solventes de extração.

Solventes	% Recuperação
Acetona/água (85+15)	0
Metanol	50
Metanol alcalino	50
Metanol/água (1+1)	33
Metanol/KCl 4%/H ₂ SO ₄ 20% (178+20+2)	70
Metanol/KCl 4% (9+1)	100
Metanol/H ₂ SO ₄ 20% (99+1)	100

Tabela 17

Recuperação da ocratoxina A com diferentes clarificantes.

Clarificantes	% Recuperação
FeCl_3 em 0.2 N NaOH	50
CuCO_3 básico, 2%	0
FeCl_3 7% em 0.2 N NaOH/ CuCO_3 básico, 2%	0
CuSO_4 10%	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30%	100

nicoluna. Para camada delgada, duas características são consideradas desejáveis: a ausência de manchas adicionais e de "streaking" (faixa de impurezas que mancha a placa do ponto de aplicação da amostra até à frente de solvente). Para minicoluna (vide desenvolvimento da minicoluna, 4.2.2.): a ausência de co-extrativos interferindo na interface sílica gel/óxido de alumínio. Os resultados mostram que sulfato de amônio produz extratos mais límpidos com milho e mandioca e sulfato cúprico, com amendoim e feijão. Ambos funcionam bem com arroz que não apresentam dificuldades para limpeza (Tabela 18).

Uma série de solventes descritos na literatura para desenvolvimento de micotoxinas em cromatografia de camada delgada, assim como um solvente proposto no presente trabalho, foram avaliados com relação a separação e resolução: (1) clorofórmio/metanol/água/ácido fórmico (90+10+1+1), (2) benzeno/metanol/ácido acético (90+5+5), (3) acetato de etila/n-hexano (3+1), citados por Takeda *et al.* (1979), (4) tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (5+4+1), de uso comum e empregado por vários autores, (5) benzeno/acetato de etila/ácido fórmico (80+20+0.5), utilizado por Josefsson e Moller (1977), (6) tolueno/acetato de etila/clorofórmio/ácido fórmico (70+50+50+20) sugerido por Gimeno (1979) e (7) tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (60+40+0.5) (Figura 10). Os demais solventes, recomendados para desenvolvimento de certas micotoxinas isoladamente, mostraram-se ainda menos adequados para separação múltipla de micotoxinas (Figura 11).

No solvente 1, a esterigmatocistina correu com a frente de solvente e não houve separação entre as aflatoxinas. Nos solventes 2 e 3, houve coincidência na localização da ocratoxina A, da esterigmatocistina e da zearalenona numa posição e das aflatoxinas em outra posição. Nos solventes 4 e 5, zearalenona e esterigmatocistina

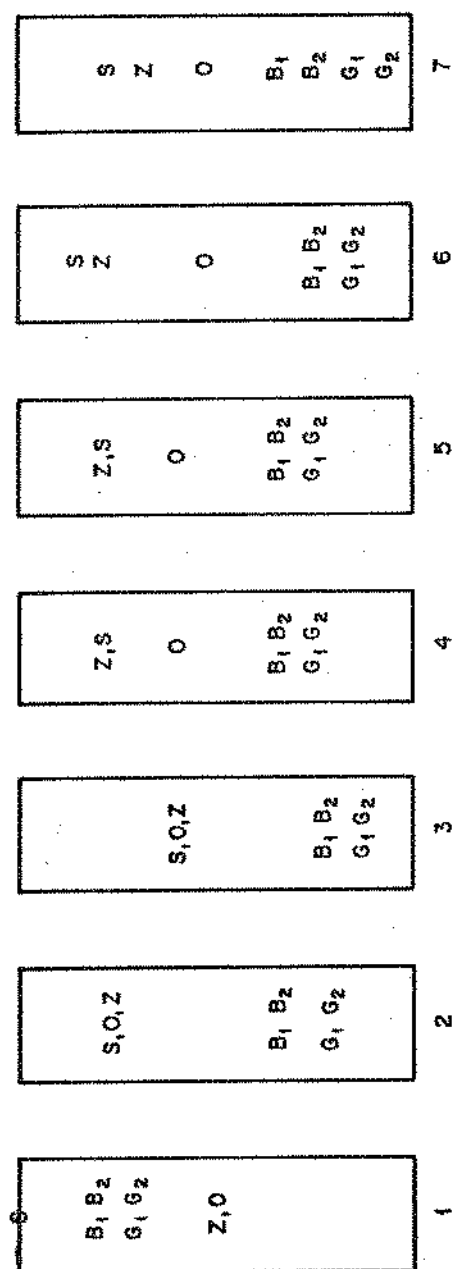


Figura 11 - Separação das micotoxinas produzida pelos diversos solventes de desenvolvimento, (1) clorofórmio/metanol/água/ácido fórmico (90+10+1+1), (2) benzeno/metanol/ácido acético (90+5+5), (3) acetato de etila/n-hexano (3+1), (4) tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (5+4+1), (5) benzeno/acetato de etila/ácido fórmico (80+20+0,5), (6) tolueno/acetato de etila/clorofórmio/ácido fórmico (70+50+50+20), (7) tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (60+40+0,5) onde s - esterigmatocistina, z - zeaxalenona, o - ocratoxina, B₁, B₂, G₁ e G₂ - aflatoxinas.

Tabela 18

Avaliação do sulfato de cobre e sulfato de amônio como clarificantes

Alimento	Clarificante	Aparência do Extrato na Placa	Aparência na Minicolumna
Milho	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30%	sem "streaking" mancha única	Boa
Milho	CuSO_4 10%	sem "streaking" manchas adicionais	Boa
Mandioca	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30%	sem "streaking" mancha adicional	Boa
Mandioca	CuSO_4 10%	leve "streaking" manchas adicionais	Boa
Amendoim	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30%	sem "streaking" mancha única	Interferente na alumina
Amendoim	CuSO_4 10%	sem "streaking" mancha única	Boa
Feijão	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30%	emulsão na extração	—
Feijão	CuSO_4 10%	sem "streaking" mancha adicional	Boa
Arroz	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30%	sem "streaking" mancha única	Boa
Arroz	CuSO_4 10%	sem "streaking" mancha única	Boa

cistina apresentaram o mesmo Rf e as aflatoxinas B₁ B₂ não separaram assim como G₁ e G₂. No solvente 6, a separação entre a esterigmatocistina e a zearalenona ocorreu quase completamente e mais uma vez as aflatoxinas B₁ e B₂ coincidiram na mesma posição assim como G₁ e G₂. Com o solvente 7 foi obtida uma completa separação de todas as micotoxinas em questão.

Na busca de um melhor limite de detecção para ocratoxina A em camada delgada, foram experimentados alguns reagentes recomendados para aumentar a fluorescência da ocratoxina A. Na Tabela 19 vemos os limites de detecção alcançados com a fluorescência nativa da ocratoxina A e a alcançada com estes tratamentos. Na verdade há uma redução na fluorescência da ocratoxina A em vez de um aumento e uma melhor sensibilidade é obtida com a ocratoxina A em sua forma natural.

4.2.2. Minicoluna para Triagem da Ocratoxina A

O desenvolvimento de uma minicoluna para ocratoxina A foi uma consequência, por um lado, da observação da grande economia de tempo e reagentes derivada do emprego de triagem para aflatoxinas, e por outro lado, do fato da ocratoxina A não possuir uma minicoluna com sensibilidade aceitável. A ocratoxina A aparenta ser uma candidata natural a este tipo de tratamento por apresentar uma fluorescência 5 vezes menor, em sílica gel, que a aflatoxina B₁. Em contraste, a zearalenona e a esterigmatocistina fluorescem cerca de 200 e 40 vezes menos, respectivamente, que a aflatoxina B₁ em sílica gel.

Na nossa experiência, as duas minicolunas descritas para ocratoxina A (Holaday, 1976 e Hald e Krogh, 1975), não apresentam a sensibilidade de respectivamente 20 e 12 µg/kg relatada por seus au

Tabela 19

Límites de detecção em camada delgada para a ocratoxina A submetida a tratamentos diversos.

Tratamento	Limite de detecção (ng)
Fluorescência nativa	0,003
NaHCO ₃ 6% em etanol	0,02
NH ₃	0,02
AlCl ₃ 20% em etanol	0,01
AlCl ₃ 20% em 75% etanol	0,01

tores. Observa-se que são constituídas por um único adsorvente na qual a banda da micotoxina é relativamente larga, o que obviamente reduz a intensidade de fluorescência da ocratoxina A. Já a minicolumna de Romer (1975) para aflatoxinas que possui comprovadamente um limite de detecção de 10 µg/kg, exibe a banda da micotoxina bem estreita e localizada na interface de dois adsorventes. Esta última condição é responsável pela nitidez e redução da largura da banda. Com este intuito uma nova minicolumna para ocratoxina A foi desenvolvida.

Numa primeira etapa foi utilizada solução padrão de ocratoxina A em vez de extratos de alimentos para testar diversos adsorventes e fases móveis como podemos ver na Tabela 20. A ocratoxina A não migrou na alumina e no florissil com clorofórmio/acetona ou com metanol como solventes. Já na sílica gel, a combinação clorofórmio/acetona não foi capaz de provocar a migração da ocratoxina A em contraste com o metanol que a eluiu da sílica gel, colocando-a na fase de florissil na minicolumna de sílica gel/florissil e na interface de sílica/alumina na minicolumna consistindo destes dois adsorventes. Em todas as minicolumnas desenvolvidas por tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (5+4+1) a ocratoxina A não apareceu. Finalmente, a coluna escolhida foi sílica gel/alumina que apresentou as características desejadas: uma banda estreita da micotoxina na interface de dois adsorventes.

Numa segunda etapa, a minicolumna de sílica gel/alumina foi submetida a extratos de milho obtidos como está descrito em 3.2.6. e adicionados de ocratoxina A. Com metanol, solvente escolhido como melhor na primeira etapa, interferentes apareceram na interface sílica gel/alumina. Outros solventes foram então testados (Tabela 21) e dentre eles surgiu tolueno/acetato de etila/ácido acético (50+49+1) como mais apropriado. Esta combinação mostrou-se adequada diante

Tabela 20

Comportamento da ocratoxina A em várias minicolunas desenvolvidas com diferentes solventes.

Coluna	Fase Móvel	Localização da banda de Ocratoxina A	Aparência da banda de Ocratoxina A
Florisil	Clorofórmio/Acetona (9+1)	na origem	-
Florisil	Metanol	a 1 cm da origem	banda difusa e larga
Florisil	Tolueno/Acetato de Etila/ Ácido fórmico (5+4+1)	não apareceu	-
Alumina Sílica gel Florisil	Clorofórmio/Acetona (9+1)	na origem	-
Alumina Sílica gel Florisil	Metanol	na origem	-
Alumina Sílica gel Florisil	Tolueno/Acetato de Etila/ Ácido fórmico (5+4+1)	não apareceu	-
Sílica gel Florisil	Clorofórmio/Acetona (9+1)	na origem	-
Sílica gel Florisil	Metanol	no Florisil	banda difusa e larga
Sílica gel Florisil	Tolueno/Acetato de Etila/ Ácido fórmico (5+4+1)	não apareceu	-
Alumina- Florisil	Clorofórmio/Acetona (9+1)	na origem	-
Alumina Florisil	Metanol	na origem	-
Alumina Florisil	Tolueno/Acetato de Etila/ Ácido fórmico (5+4+1)	não apareceu	-
Sílica gel Alumina	Clorofórmio/Acetona (9+1)	na origem	-
Sílica gel Alumina	Metanol	na interface sílica/alumina	banda estreita e nítida
Sílica gel Alumina	Tolueno/Acetato de Etila/ Ácido fórmico (5+4+1)	não apareceu	-

Tabela 21

Avaliação de solventes para desenvolvimento da minicoluna sílica gel/alumina com extratos de milho adicionados de ocratoxina A.

Solventes	Aparência da minicoluna
Metanol	Interferentes na interface sílica gel/alumina
Tolueno/Acetato de Etila/ Ácido acético (50+49+1)	Ausência de interferentes, banda de toxina es treita e nítida na interface sílica gel/alumi na
Tolueno/Acetato de Etila/ Ácido acético (50+48+2)	Ausência de interferentes, banda da toxina es treita e nítida na interface sílica gel/alumi na
Tolueno/Acetato de Etila/ Ácido acético (50+47+3)	Banda da toxina não apareceu
Tolueno/Acetato de Etila (1+1)	Banda da toxina na origem

dos extratos de outros alimentos como mandioca, feijão, amendoim e arroz. Em todos os casos ficou evidenciado um limite de detecção de 80 µg/kg.

4.2.3. Recuperação e Repetibilidade do Método Desenvolvido para Ocratoxina A

Foram determinados a recuperação e o coeficiente de variação do método desenvolvido utilizando amostras de milho, mandioca, arroz, feijão e amendoim artificialmente contaminadas com cinco níveis de ocratoxina A. As determinações foram realizadas em triplicata para cada nível. A recuperação obtida foi de 86-160% e coeficiente de variabilidade de 0-26% (Tabela 22), valores considerados excelentes para micotoxinas.

4.2.4. Recuperação e Repetibilidade do Método Desenvolvido para Zearalenona, Esterigmatocistina e Aflatoxina B₁

O método desenvolvido para determinação de ocratoxina A em grãos foi testado para incluir as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, zearalenona e esterigmatocistina. Amostras artificialmente contaminadas de milho, mandioca, arroz, feijão e amendoim foram empregadas, mas, desta vez cada micotoxina em questão foi adicionada em três níveis de contaminação. As determinações realizadas em triplicata revelaram recuperação e coeficientes de variação de respectivamente, 90-101% e 0-24% para aflatoxina B₁ (Tabela 23), 98-128% e 0-17% para esterigmatocistina (Tabela 24) e 96-107% e 0-17% para zearalenona (Tabela 25). Portanto, o método demonstrou excelente recuperação e precisão também para estas micotoxinas.

Tabela 22

Recuperação e repetibilidade com amostras artificialmente contaminadas com ocratoxina A.

Alimento	Quantidade adicionada ($\mu\text{g/kg}$)	% Recuperação Média (*)	Coefficiente de Variação (%)
Milho	400	86	21
	200	102	4
	80	111	17
	40	111	17
	10	89	18
Arroz	400	93	14
	200	107	0
	80	133	0
	40	133	0
	10	107	0
Amendoim	400	107	0
	200	107	0
	80	133	0
	40	133	0
	10	160	0
Mandioca	400	98	16
	200	125	24
	80	133	0
	40	118	26
	10	107	0
Feijão	400	98	16
	200	107	0
	80	133	0
	40	133	0
	10	107	0

(*) Média de três determinações.

Tabela 23

Recuperação e reprodutibilidade com amostras artificialmente contaminadas com aflatoxina B₁.

Alimento	Quantidade adicionada (µg/kg)	% Recuperação Média (*)	Coefficiente de Variação (%)
Milho (fubã)	4,7	100	0
	29,5	91	11
	76,7	95	8
Mandioca (farinha)	4,7	100	0
	29,5	96	0
	76,7	99	0
Arroz	4,7	100	0
	29,5	96	0
	76,7	98	0
Feijão	4,7	-	-
	29,5	91	1
	76,7	90	16
Amendoim	4,7	100	0
	29,5	101	9
	76,7	94	8

(*) Média de três determinações.

- Não detectada.

Tabela 24

Recuperação e reprodutibilidade com amostras artificialmente contaminadas com esterigmatocistina.

Alimento	Quantidade adicionada ($\mu\text{g/kg}$)	% Recuperação Média (*)	Coefficiente de Variação (%)
Milho (fubá)	35	-	-
	65	-	-
	218	107	17
Mandioca (farinha)	35	100	0
	65	107	0
	218	128	0
Arroz	35	100	0
	65	107	16
	218	117	0
Feijão	35	100	16
	65	98	17
	218	107	0
Amendoim	35	100	0
	65	107	0
	218	112	14

(*) Média de três determinações.

- Não detectada.

Tabela 25

Recuperação e reprodutibilidade com amostras artificialmente contaminadas com zearalenona.

Alimento	Quantidade adicionada ($\mu\text{g/kg}$)	% Recuperação Média (*)	Coefficiente de Variação (%)
Milho (fubá)	165	100	0
	1031	107	0
	2680	96	0
Mandioca (farinha)	165	-	-
	1031	107	0
	2680	96	0
Arroz	165	100	0
	1031	107	0
	2680	96	0
Feijão	165	100	0
	1031	107	0
	2680	107	17
Amendoim	165	-	-
	1031	107	0
	2680	96	0

(*) Média de três determinações.

- Não detectada.

4.2.5. Comparação com Outros Métodos

As primeiras 117 amostras do levantamento descrito no item 4.3. foram analisadas tanto pelo método proposto como pelo método de Romer (1975), em termos de aflatoxinas. As únicas quatro amostras constatadas positivas para aflatoxinas pelo primeiro método foram as indicadas como positivas pelo segundo método.

Adicionalmente, uma comparação com o método de Romer para aflatoxinas, foi executada por dois analistas independentes, tomando uma amostra de arroz naturalmente contaminada (Tabela 26). Os resultados mostraram-se coerentemente próximos, com coeficientes de variação dentro do aceitável para micotoxinas.

Três amostras de milho naturalmente contaminado com zearalenona foram analisadas pelo método proposto e pelo método da A.O.A.C. (1984) modificado com resultados também concordantes (Tabela 27).

Tanto no caso da zearalenona como das aflatoxinas, o método proposto apresenta consistentemente valores maiores. Talvez isto ocorra devido a um menor número de etapas (evitando perdas durante a análise) quando comparado ao método de Romer e um sistema mais eficiente de limpeza quando comparado ao método da A.O.A.C. para zearalenona. O coeficiente de variação mais elevado (26.5) em relação ao método de Romer (15.75) não é significativo pois está dentro do aceito para avaliações em camada delgada de padrões e abaixo do que se encontra quando amostras reais são tratadas por analistas independentemente (Nesheim, 1979) (Pohland *et al.*, 1979) (Friesen e Caren, 1983). Este tipo de teste serve para mostrar a confiabilidade do método. No entanto, somente de estudos colaborativos envolvendo pelo menos 6 laboratórios, é que surgirão os verdadeiros coeficientes de variabilidade. Amostras naturalmente con-

Tabela 26

Determinação de aflatoxinas ($\mu\text{g/kg}$), em arroz naturalmente contaminado, pelo método de Romer (1975) e pelo método proposto.

	Método de Romer (*)			Nosso Método		
	B ₁	B ₂	G ₁	B ₁	B ₂	G ₁
	29,1	6,2	15,1	37,5	13,2	18,1
	29,1	6,2	15,1	62,5	13,2	18,1
	29,1	6,2	15,1	37,5	13,2	18,1
	21,8	6,2	15,1	37,5	13,2	18,1
	21,8	6,2	15,1	37,5	13,2	18,1
	21,8	6,2	15,1			
Média	25,4	6,2	15,1	42,5	13,2	18,2
Desvio Padrão	4,0	0	0	11,2	0	0
Coef. Variabilidade (%)	15,7	0	0	26,5	0	0

(*) Realizado independentemente por outro analista.

Tabela 27

Teores de zearalenona, em amostras de milho naturalmente contaminado, pelo método A.O.A.C. modificado e pelo método proposto (mg/kg)

Amostra	Método da A.O.A.C. Modificado (*)	Nosso Método
A	5,8	6,9
B	7,8	11,1
C	7,8	11,1

Os resultados são médias de duplicatas.

(*) Realizado independentemente por outro analista em outra instituição.

taminadas com esterigmatocistina não foram conseguidas para que trabalho semelhante fosse executado.

4.3. Incidência de Ocratoxina A, Zearalenona, Esterigmatocistina e Aflatoxinas em Alimentos Comercializados na Região de Campinas de Maio/85 a Junho/86

Tratando-se de um dos primeiros trabalhos do gênero no país, houve intenção de caracterizar a nível de consumidor o tipo de alimento sendo recebido, sem preocupação com a origem das amostras, se doméstica ou importada, e no caso de amostra doméstica, sua proveniência em termos de região produtora.

Tal enfoque deriva da convicção que numa situação de falta de informações levantamentos devam abordar primeiramente os alimentos mais importantes na dieta local e sob a forma que é oferecido ao consumidor. Os alimentos que venham eventualmente a ser implicados em contaminação devem merecer maior atenção partindo-se para localização do ponto onde surge a contaminação do início da produção até o consumo, assim como dos fatores de contaminação. Numa etapa seguinte, soluções para o problema podem ser estudadas e sugeridas.

Uma linha de ação desta natureza está em oposição à delineada pela F.A.O. (1977) ao estabelecer que levantamentos devem ser dirigidos a alimentos nos primeiros estágios de produção, isto é, colheita e estocagem. Quando problemas marcantes na matéria prima são detectados, levantamentos adicionais nos produtos derivados devem ser realizados. Justifica tal orientação como sendo menos dispendiosa e, portanto, acessível a países dotados de poucos recursos. No mesmo documento, reconhece a F.A.O. que a possibilidade de contaminação em estágios posteriores de produção e distribuição não

deve ser desprezada.

O levantamento incluiu 296 amostras de alimentos comercializados na região de Campinas, cobrindo 172 marcas diferentes e 53 amostras a granel (Tabela 28). Quatro grupos, milho, mandioca, arroz e feijão, foram abordados por representarem uma parcela importante na alimentação da população em geral. No grupo do milho, 8 tipos de produtos foram examinados (130 amostras). No caso da mandioca, apenas a farinha (45 amostras), crua, torrada e temperada, foi inspecionada, uma vez que produtos a base de amido de mandioca, devido a natureza do processamento são menos passíveis de contaminação. No grupo do feijão, 10 cultivares foram analisados (61 amostras). No grupo do arroz (60 amostras), a ênfase ficou no arroz "in natura" (52 amostras) e secundariamente no arroz parboilizado ou maleikizado (8 amostras).

Das 296 amostras, 14 apresentaram-se positivas, portanto, a contaminação foi de 4,7%. As percentagens de amostras positivas em cada grupo (Tabela 29) permaneceram razoavelmente próximas do valor geral para todas as amostras, com um máximo para feijão (6,6%) e um mínimo para o arroz (3,3%). Não devemos, porém, perder de perspectiva que este é o resultado de apenas um ano de trabalho. É importante saber o que ocorre ano a ano, principalmente durante períodos cujas condições climáticas são favoráveis à produção de micotoxinas. Além disso, o levantamento ateu-se à região de Campinas. A situação em outros pontos do país pode ser completamente diferente.

As amostras positivas e o seu teor de toxina estão na Tabela 30. A legislação em vigor estabelece que a soma das aflatoxinas B_1 e G_1 não deve exceder 30 $\mu\text{g/kg}$ e nada determina sobre outras micotoxinas. Desta maneira 7 das amostras seriam condenadas dentre as 14 encontradas contaminadas.

Tabela 28

Incidência de micotoxinas(*) em alimentos comercializados na região de Campinas (maio/85 - junho/86)

Alimento	Tipo	Nº de Amostras	Nº de Marcas	Granel	Amostras Positivas
Milho	verde enlatado	32	18	-	-
	fubá	27	18	2	-
	farinha branca	6	6	-	-
	farinha amarela	18	11	1	-
	pré-cozido	13	8	-	-
	pipoca	15	8	5	5
	sêmola	7	4	-	-
	canjica	12	6	4	1
	Total	130	76	12	6
Mandioca	farinha crua	33	18	7	2
	farinha torrada	9	6	1	-
	farinha temperada	3	3	-	-
	Total	45	27	8	2
Arroz	"in natura"	52	40	5	2
	parboilizado	8	5	-	-
	Total	60	45	5	2
Feijão	"in natura"				
	Preto	14	7	7	-
	Branco	4	4	-	-
	Jalo	3	2	1	-
	Mulatinho	3	0	3	1
	Carioca	9	3	5	-
	Cariocoquinha	10	5	5	2
	Rajado	7	5	2	-
	Rosinha	3	1	2	1
	Roxinho	5	3	2	-
	Fradinho	3	-	3	-
	Total	61	24**	30	4
TOTAL		296	172	54	14

* Micotoxinas pesquisadas: Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, Ocratoxina A, Zearalenona, Esterigmatocistina.

** O total de marcas não corresponde à soma dos valores da coluna uma vez que há repetição de marcas nas diferentes variedades.

Tabela 29

Proporção de amostras contaminadas de acordo com o tipo de alimentos:
(Levantamento maio/85 a junho/86)

Alimento	Amostras contaminadas (%)	Rejeitáveis pela legislação (%)*
Todos os examinados	4,7	2,4
Alimentos a base de Milho	4,6	3,8
Farinha de Mandioca	4,4	0
Arroz	3,3	1,7
Feijão	6,6	3,3

* A legislação brasileira regulamenta apenas a contaminação com aflatoxinas, especificando um limite de 30 µg/kg de aflatoxinas B₁ + G₁.

Tabela 30

Teores de micotoxinas nas amostras positivas

Alimento	Micotoxina encontrada	Teor ($\mu\text{g/kg}$)
Milho para Pipoca	Aflatoxina	38 B ₁
Milho para Pipoca	Aflatoxina	47 B ₁
Milho para Pipoca	Aflatoxina	38 B ₁
Milho para Pipoca	Aflatoxina	20 B ₁
Milho para Pipoca	Aflatoxinas	32 B ₁ , 18 G ₁ , 8 G ₂
Milho para Canjica	Ocratoxina A	32
Farinha de Mandioca Crua	Ocratoxina A	65
Farinha de Mandioca Crua	Ocratoxina A	32
Arroz	Aflatoxinas	38 B ₁ , 15 B ₂ , 20 G ₁
Arroz	Aflatoxina	26 B ₁
Feijão Cariquinha	Ocratoxina A	94
Feijão Rosinha	Ocratoxina A	160
Feijão Cariquinha	Aflatoxinas	39 B ₁ , 21 G ₁ , 4 G ₂
Feijão Mulatinho	Aflatoxinas	52 B ₁ , 31 G ₁ , 8 G ₂

Tomado isoladamente, o milho para pipoca apresentou a maior incidência de amostras positivas (um terço das amostras). Um dado que vem exigir um exame mais aprofundado da situação desse tipo de milho.

4.4. Importância da Confirmação na Análise de Micotoxinas

A necessidade de confirmação dos resultados pode ser apreciada na Tabela 31. De 31 amostras de milho, feijão, arroz e mandioca, com 34 resultados inicialmente presuntivos positivos (1% com aflatoxina, 8 com ocratoxina A, 5 com zearalenona e 3 com esterigmatocistina) somente 14 foram confirmadas (9 com aflatoxina e 5 com ocratoxina A). Sem tal cuidado chegaríamos a um resultado falso de 10,7% amostras contaminadas quando na verdade 4,7% realmente continham micotoxinas do total de 296 amostras analisadas.

Nas amostras presuntivas positivas para aflatoxinas e para ocratoxina A, o uso de co-cromatografia e o desenvolvimento em dois outros sistemas solventes, foram suficientes para apontar os falsos positivos. Especialmente útil no caso das aflatoxinas vem a ser um segundo desenvolvimento em éter etílico, da mesma placa anteriormente submetida ao clássico acetona/clorofórmio (1+9). O emprego do éter etílico foi também recomendado por Purchio (1970) em seu trabalho com farinha de trigo. As amostras que se mantiveram positivas foram então submetidas à derivação química onde todas foram confirmadas.

Para a confirmação da zearalenona, a A.O.A.C. (1984) recomenda, em vez de uma derivação química, a exposição à luz ultravioleta de ondas longas (366 nm), seguida à de ondas curtas (254 nm). Tanto o padrão como a mancha suspeita, no caso de uma amostra positiva, devem apresentar uma fluorescência azul-esverdeada bem

Tabela 31

Amostras presuntivas positivas e sua confirmação.

Alimento	Micotoxina	Confirmação
Feijão Carioquinha	ocratoxina A	+
Feijão Rosinha	ocratoxina A	+
Feijão Branco	ocratoxina A	-
Feijão Roxinho	ocratoxina A	-
Feijão Mulatinho	aflatoxina	+
Feijão Carioca	zearalenona	-
Feijão Carioca	aflatoxina	-
Feijão Fradinho	zearalenona	-
Feijão Carioquinha	aflatoxina	-
Feijão Carioca	aflatoxina	-
Arroz	aflatoxina	+
Arroz	esterigmatocistina	-
Arroz	esterigmatocistina	-
Arroz	esterigmatocistina	-
Arroz	ocratoxina A	-
Arroz	aflatoxina	+
Arroz	aflatoxina	-
Arroz	zearalenona	-
Milho Pipoca	aflatoxina	+
Milho Pipoca	aflatoxina	+
Milho Pipoca	aflatoxina	-
Milho Pipoca	aflatoxina	+
Milho Pipoca	aflatoxina	-
Milho Pipoca	aflatoxina	-
Milho Pipoca	aflatoxina	-
Milho Pipoca	aflatoxina	+
Milho Pipoca	aflatoxina	+
Milho Verde em Conserva	aflatoxina	-
Milho Canjica	ocratoxina A	+
Farinha de Mandioca Crua	aflatoxina	-
Farinha de Mandioca Crua	zearalenona	-
	ocratoxina A	+
Farinha de Mandioca Crua	zearalenona	-
	ocratoxina A	+
Total de resultados presuntivos positivos: 34 (11,5%)		
Total de amostras presuntivas positivas: 31 (10,7%)		
Total de amostras confirmadas: 14 (4,7%)		

mais intensa a 254 nm que a 366 nm. Em seguida, uma nebulização com solução de cloreto de alumínio 20%, aquecimento e inspeção a 366 nm devem revelar ambas as manchas com uma fluorescência azulada e bem mais intensa. Dentre as 5 amostras com resultados presuntivos positivos para zearalenona, obtivemos uma confirmação para duas por este processo. Porém, ao submeter as amostras à co-cromatografia em dois outros sistemas solventes, o resultado foi negativo. As outras três amostras mostraram-se negativas tanto pelo procedimento de confirmação da A.O.A.C. como quando submetidas a desenvolvimento em outros sistemas solventes. Estes resultados indicam que uma maior confiabilidade seria alcançada com o emprego de um procedimento de derivação química.

Duas das três amostras presuntivas positivas para esterigmatocistina apresentaram um resultado inconclusivo na derivação química. As placas exibiram "streaking" e manchas interferentes que dificultaram a sua avaliação. O emprego do desenvolvimento com co-cromatografia em dois outros sistemas solventes foi o responsável pela indicação da solução correta.

Uma economia de tempo e reagentes é conseguida quando a co-cromatografia acompanhada do desenvolvimento em dois sistemas solventes é realizada antes da derivação química. Um resultado negativo nesta etapa elimina a necessidade desta última. Finalmente, durante o trabalho de confirmação das amostras presuntivas positivas, ficou evidenciado que no estágio atual da metodologia para micotoxinas que emprega cromatografia em camada delgada, somente o uso combinado de co-cromatografia, derivação química e desenvolvimento em dois sistemas solventes adicionais, permite resultados seguros. Como corolário, levantamentos realizados sem o devido cuidado com a etapa de confirmação tornam-se passíveis de dúvidas quanto a sua validade.

4.5. Comparação dos Custos e Tempo de Execução da Metodologia Desenvolvida com os Métodos Preconizados pela A.O.A.C.

O cálculo dos custos envolvidos na análise destas micotoxinas pela metodologia da A.O.A.C., em comparação com o método proposto pode ser apreciado nas Tabelas 32 e 33. Os custos de reagentes vem a ser 7.5 maiores para análises executadas com o sistema da A.O.A.C. O tempo requerido também é bem maior: 7.2 vezes mais no primeiro caso que no segundo. O alto custo e morosidade dos métodos da A.O.A.C. devem-se, principalmente, a determinação individual das micotoxinas e uso de coluna cromatográfica para a limpeza dos extratos.

4.6. Resultados Preliminares com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O emprego de cromatografia líquida de alta eficiência foi avaliado, utilizando um aparelho equipado com detector ultra-violeta/visível e coluna de sílica gel. Aqui, mais uma vez, o uso de acetônitrilo, embora o solvente mais utilizado em CLAE no exterior, foi evitado devido a seu alto custo e toxidez.

A zearalenona e a esterigmatocisina eluem com uma separação apropriada quando n-hexano/isopropanol (97+3) com vazões de 0,8 a 1,5 mL/min é utilizado como fase móvel. Nestas condições a separação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ não foi conseguida assim como em vários outros sistemas.

A ocratoxina A não elue nas condições mais drásticas permissíveis para uma coluna de sílica, tornando-se necessário uma coluna de fase reversa. Uma possibilidade, neste caso, está na deter-

Tabela 32

Tempo e custos envolvidos nos métodos da A.O.A.C., 1984.

Micotoxina	Custo (Cz\$)*	Tempo (horas)
Aflatoxina (C.B.)	342	5,5
Ocratoxina A	243	3,5
Zearalenona	362	5,5
Esterigmatocistina	562	3,5
TOTAL	1509	18

* Calculado em março/87.

Tabela 33

Tempo e custos envolvidos no método proposto.

Micotoxinas	Custo (Cz\$)	Tempo (horas)
Aflatoxinas, Ocratoxina A		
Zearalenona, Esterigmatocistina	200	2,5

minação de zearalenona e esterigmatocistina por CLAE e ocratoxina A e aflatoxinas por CD (cromatografia em camada delgada), empregando o mesmo extrato obtido como descrito no método proposto, 3.5.6. Uma vantagem nesta combinação de técnicas está na maior sensibilidade para zearalenona e esterigmatocistina e uma desvantagem está no custo mais elevado para a análise (Tabela 34).

A limpeza com clarificantes realizada no método proposto, 3.5.6., mostrou-se insuficiente para o detector de ultra-violeta/visível. Uma etapa adicional de limpeza, faz-se necessária. Por outro lado, seria de interesse verificar se um detector de fluorescência, por ser específico, seria capaz de amenizar ou resolver o problema.

A rapidez alegada, na literatura, para métodos que empregam CLAE é ilusória e calculada de uma maneira facciosa. Simplesmente, os autores consideram tão somente o tempo de injeção no cromatógrafo até o término do cromatograma. Note-se que a extração e limpeza da amostra vem a ser geralmente mais demoradas para CLAE (mais exigente com a limpeza dos extratos) que CD, e em alimentos a limpeza é especialmente crucial. Além disso, padrões e amostras são colocados na mesma CD, enquanto padrões são injetados separadamente no cromatógrafo líquido. Tudo isto torna o procedimento por CLAE mais demorado que por CD. O tempo necessário para preparo da camada delgada é compensado pelo tempo necessário para desgaseificação do solvente, filtração do solvente e da amostra e para o instrumento atingir estabilidade.

Tabela 34

Comparação de CLAE e CD para determinação de micotoxinas em alimentos.

	CLAE	CD
Limite de detecção (µg/kg)		
Aflatoxina B ₁	2	2
Ocratoxina A	4	10
Zearalenona	6	165
Esterigmatocistina	8	35
Custos (em termos de reagentes) (Cz\$)	~ 424*	200
Número de amostras executadas por semana	5	28

* Não inclui o alto custo do aparelho, coluna, coluna de guarda e serviço de manutenção.
Cálculo do preço de março de 1987.

5. CONCLUSÕES

- 1) Uma metodologia analítica simples, rápida, precisa e de baixo custo para análise simultânea de aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 , ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina, foi desenvolvida. Esta vem a ser a maior contribuição do presente trabalho. Laboratórios governamentais de fiscalização poderão realizar rotineiramente este tipo de análise até agora restrita a poucos laboratórios e tornam-se viáveis a execução de levantamentos semelhantes ou programas de monitoramento em todo o país.
- 2) A incidência de contaminação e os teores encontrados em milho e seus produtos, farinhas de mandioca, feijão e arroz, comercializados na região de Campinas, no período de maio de 1985 a junho de 1986, podem ser considerados toleráveis.
- 3) O levantamento realizado apontou o milho para pipoca como um alimento cuja situação merece um exame mais cuidadoso, uma vez que um terço das amostras encontravam-se contaminadas (20 a 47 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxina B_1) e o fato de ter largo consumo entre crianças.
- 4) Os resultados do levantamento ressaltaram mais uma vez, a obrigatoriedade de procedimentos confirmatórios na análise de micotoxinas. Para atingir-se um resultado seguro, na falta de acesso a um espectômetro de massa, é recomendável o uso conjunto de derivação química, co-cromatografia e desenvolvimento em dois solventes adicionais.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABEDI, Z.H.; SCOTT, P.M. 1969. Detection of toxicity of aflatoxins, sterigmatocystin, and other fungal toxins by lethal action on zebra fish larvae. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 52: 963.
- ABRAMSON, D.; MILLS, J.T. 1985. Mycotoxin production during storage. em SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds) 1985 "Mycotoxins: a canadian perspective". National Research Council of Canada, Ottawa, p. 69-80.
- ABRAMSON, D.; SINHA, R.N.; MILLS, J.T. 1983. Mycotoxins and odor formation in barley stored at 16 and 20% moisture in Manitoba. Cereal Chem. 60: 350.
- ASENSIO, E.; SARMENTO, I.; DOSE, K. 1982. Quantitative determination of ochratoxin A in vegetable foods. Fresenius Z. Anal. Chem. 311: 511.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. 1984. "Official Methods of Analysis", 14ª edição. Arlington, Virginia, Capítulo 26.
- AWE, M.J.; SCHRANZ, J.L. 1981. High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in spices. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64: 1377.
- BALZER, I.; BOGDANIC, C.; PEIJNJAK, S. 1978. Rapid thin layer chromatographic method for determination aflatoxin B₁, ochratoxin A and zearalenone in corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61: 584.
- BECKWITH, A.C.; STOLOFF, L. 1968. Fluorodensitometric measurement of aflatoxin thin layer chromatograms. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 51: 602.
- BENNETT, G.A. 1981. Zearalenone, em Report on Mycotoxins, Stoloﬀ, L. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64: 373.
- BENNETT, G.A.; SHOTWELL, O.L. 1979. Zearalenone in cereal grains. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 812.

- BENNETT, G.A.; SHOTWELL, O.L.; KWOLEK, W.F. 1985. Liquid chromatographic determination of α -zearalenol and zearalenone in corn: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68: 958.
- BLANEY, B.J.; MOORE, C.J.; TYLER, A.L. 1984. Mycotoxins and fungal damage in maize harvested during 1982 in far north Queensland. Aust. J. Agric. Res. 35: 463.
- BROWN, M.H.; SZCZECZ, G.M.; PURMALIS, B.P. 1976. Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 37: 331 citado em SHANK, R.C. (ed.) 1981. "Mycotoxins and N-Nitroso Compounds: environmental risks". CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- BULLERMAN, L.B. 1979. Significance of mycotoxins to food safety and human health. J. Food Protec. 42: 65.
- BUSBY JR., W.F.; WOGAN, G.N. 1981a. em SHANK, R.C. (ed.) 1981 "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks", CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, vol. II, p. 129-136.
- BUSBY JR., W.F.; WOGAN, G.N. 1981b. em SHANK, R.C. (ed.) 1981 "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks", CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. vol. II, p. 145-154.
- BUSBY JR., W.F.; WOGAN, G.N. 1981c. em SHANK, R.C. (ed.) 1981 "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks". CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. vol. II, p. 137-144.
- BUSBY JR., W.F.; WOGAN, G.N. 1981d. em SHANK, R.C. (ed.) 1981 "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks". CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. vol. II, p. 3-28.
- CAMPBELL, A.D. 1979. Sampling foodstuffs for mycotoxin analysis. Pure Appl. Chem. 52: 205.
- CARLTON, W.W.; SZCZECZ, G.M. 1978. em WYLLIE, T.D.; MOREHOUSE, L. G. (eds.) 1978 "Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses". Marcel Dekker, Inc., Nova York, p. 333-488.

CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMAN, H.H. 1969. "Grain storage: the role of fungi in quality loss". Univ. of Minnesota Press, Minneapolis, Minn. Citado em SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds.) 1985 "Mycotoxins: a canadian perspective". National Research Council of Canada, Ottawa, p. 70.

COHEN, H.; LAPOINTE, M.R. 1980. Sephadex LH-20 cleanup, high pressure liquid chromatographic assay, and fluorescence detection of zearalenone in animal feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63: 642.

COHEN, H.; LAPOINTE, M. 1981. High pressure liquid chromatographic determination and fluorescence detection of aflatoxins in corn and dairy feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64: 1372.

COLE, R.J.; COX, R.H., 1981. "Handbook of toxic fungal metabolites", Academic Press, Nova York. p. 67-93.

COLLINS, G.J.; ROSEN, J.D. 1979. Gas-liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for T-2 toxin in milk. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62: 1274.

CHU, F.S. 1984. Immunoassays for analysis of mycotoxins. J. Food Protect. 47: 562.

CUCULLU, A.D.; LEE, L.S.; MAYNE, R.X. 1966. Determination of Aflatoxins in individual peanuts and peanut sections. J. Am. Oil Chem. Soc. 43: 89.

DAVIS, N.D.; DIENER, U.L. 1979. A fluorometric iodine rapid screen method for aflatoxin in corn. J. Appl. Biochem. 1: 126.

DAVIS, N.D.; DIENER, U.L. 1980. Confirmatory test for the high pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin B₁. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63: 107.

DAVIS, N.D.; DIENER, U.L. 1983. em DIENER, U.L.; ASQUITH, R.L.; DIECKENS, J.W. (eds.) 1983 "Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn" Southern Cooperative Series Bulletin 279. Craftsman Printers, Inc., Opelika, Alabama. p. 72-93.

- DE VRIES, J.W.; CHANG, H.L. 1982. Comparison of rapid high pressure liquid chromatographic and C.B. method for determination of aflatoxins in corn and peanuts. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65: 206.
- DICKENS, F.; JONES, H.E.H.; WAYNFORTH, H.B. 1966. Oral, subcutaneous and intratracheal administration of carcinogenic lactones and related substances: The intratracheal administration of cigarette tar in the rat. Br. J. Cancer 20: 134, citado em WILLIE, T.D., MOREHOUSE, L.G. (eds.) 1978. "Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses", Marcel Dekker, Inc. Nova York. p. 389.
- DURACKOVA, Z.; BETINA, V.; NEMEC, P. 1976. Systematic analysis of mycotoxins by TLC. J. Chromatogr. 116: 141.
- DUTTON, M.F.; WESTLAKE, K. 1985. Occurrence of mycotoxin in cereals and animals feedstuffs in Natal, South Africa. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68: 839.
- ERLICH, K.C.; LEE, L.S. 1984. Mycotoxins in grain dust: method for analysis of aflatoxins, ochratoxins A, zearalenone, vomitoxin, and secalonin acid D. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67: 963.
- EIROA, M.N.U.; ARCKOLL, D.B. 1978. Investigação de aflatoxinas, patulina e esterigmatocistina em amostras de diversos tipos de farinhas. Bol. ITAL 57: 113.
- ENGSTROM, G.W.; RICHARD, J.L.; CYSEWSKI, S.J. 1977. High pressure liquid chromatographic method for detection and resolution of rubratoxin, aflatoxin, and other mycotoxins. J. Agric. Food Chem. 25: 833.
- EPPLEY, R.M. 1968. Screening method for zearalenone, aflatoxin, and ochratoxin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 51: 74.
- EPPLEY, R. M.; STOLOFF, L.; CAMPBELL, A.D. 1968. Collaborative study of "A versatile procedure for assay of aflatoxin in peanut products" including preparatory separation and confirmation of identity. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 51: 67.
- F.A.O. 1977. Mycotoxin Surveillance. A Guideline. FAO Food Control Series nº 4.

- FISCHBACH, H.; RODRICKS, J.V. 1973. Current efforts of the Food and Drug Administration to control mycotoxins in food. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56: 767.
- FONSECA, H. 1973. Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim (Arachis hypogaea L.) na região noroeste do estado de São Paulo. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz" 30: 387.
- FONSECA, H. 1973. Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim (Arachis hypogaea L.) na região Paulista Nova, do estado de São Paulo. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz" 30: 403.
- FONSECA, H. 1975. Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim (Arachis hypogaea L.) região araraquarense do estado de São Paulo. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz" 30: 7.
- FONSECA, H. 1976. Estudo da aflatoxina no amendoim, da colheita à industrialização, na região de Matão, SP. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz" 33: 365.
- FONSECA, H. 1976. Estudos da aflatoxina no amendoim, da colheita à industrialização, na região de Monte Alto, SP. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz" 33: 375.
- FONSECA, H. 1976. Estudos da aflatoxina no amendoim, da colheita à industrialização, na região de Santa Adélia, SP. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz" 30: 385.
- FONSECA, H. 1976. Estudos da aflatoxina no amendoim, da colheita à industrialização, na região de Fernandópolis, SP. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz" 33: 395.
- FONSECA; H.; NERY, H.D. 1970. Ocorrência de aflatoxina em pastas de amendoim. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz" 27: 181.
- FONSECA, H.; NOGUEIRA, J.N.; GRANER, M.; OLIVEIRA, A.J.; CARUSO, J. G.; BORALLI, C.; CALORI, M.A.; KHATOUNIAN, C.A. 1983. Natural occurrence of mycotoxins in some brazilian foods. II (Lecture) Proceedings of the 6th International Congress of Food Science and Technology 3: 53, citado no Food Science and Technology Abstracts. 1984. 16:23.

FRANCIS JR., O.J.; LIPINSKI, L.J.; GAUL, J.A.; CAMPBELL, A.D. 1982. High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in peanut butter using a silica gel-packed flowcell for fluorescence detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65: 672.

FRANK, H.K. 1981. REISS, J. (ed.) em 1981 "Mycotoxine in Lebensmitteln" Gustav Fischer, Stuttgart. p. 3-9.

FRIESEN, M.D.; GARREN, L. 1982. International mycotoxin check sample program: Part I. Report on Laboratory performance for determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in raw meal, and yellow corn deoilled peanut meal, and yellow corn meal. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65: 855.

FRIESEN, M.D.; GARREN, L. 1983. International mycotoxin check sample survey program. Part III. Report on performance of participation laboratories for determining ochratoxin A in animal feed. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66: 256.

FRIESEN, M.D.; WALKER, E.A.; CASTEGNARO, M. 1980. International mycotoxin check sample program. Part I. Report on the performance of participating laboratories. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63: 1057.

GIMENO, A. 1979. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62: 579.

GOLINSKI, P.; GRABARKIEWICZ-SZCZESMA, J. 1984. Chemical confirmatory tests for ochratoxin A, citrinin, penicillic acid, sterigmatocystin, and zearalenone performed directly on thin layer chromatographic plates. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67: 1108.

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

GRABARKIEWICZ-SZCZESMA, J.; GOLINSKI, P.; CHELKOWSKI, J. 1985. Mycotoxins in cereal grain. Part II. Simple multidection procedure for determination of 11 mycotoxins in cereals. Die Nahrung 29: 229.

- HAGHIGHI, E.; THORPE, C.W.; POHLAND, A.E.; BARNETT, F. 1981. Development of a sensitive high performance liquid chromatographic method for detection of aflatoxins in pistachio nuts. J. Chromatogr. 206: 101.
- HALD, B.; KROGH, P. 1975. Detection of ochratoxin A in barley, using silica gel minicolumns. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58: 156.
- HAMASAKI, T.; HATSUDA, Y. 1977. em RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C. W.; MEHLMAM, M.A. (eds.) 1977. Pathtox Publishers, Inc., Park Forest, Illinois, p. 597-607.
- HARWIG, J. 1974. em PURCHASE, I.F.H. (ed.) Ochratoxin A and related metabolites em "Mycotoxins" Elsevier, Nova York, cap. 16, citado em SHANK, R.C. (ed.), 1981 "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks", CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- HARWIG, J.; SCOTT, P.M. 1971. Brine shrimp (Artemia salina L.) larvae as a screening system for fungal toxins. Appl. Microbiol. 21: 1011.
- HARWIG, J.; CHEN, Y.K. 1974. Some conditions favoring production of ochratoxin A and citrinin by Penicillium viridicatum in wheat and barley. Can J. Plant Sci. 54:17. Citado em SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds.) 1985 "Mycotoxins: A canadian perspective". National Research Council of Canada, Ottawa, Canada. Publicação nº 22848.
- HAYES, A.W.; HOOD, R.D.; LEE, H.L. 1974. Teratogenic effects of ochratoxin A in mice Teratology 9: 93, citado em SHANK, R.C. (ed.) 1981 "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks", CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- HOLADAY, C.E. 1976. A rapid screening method for the aflatoxins and ochratoxin A. J. Am. Oil Chem. Soc. 53: 603.
- HOLADAY, C.E. 1968. Rapid method for detecting aflatoxins in peanuts. J. Am. Oil Chem. Soc. 45: 680.
- HOLADAY, C.E. 1981. Minicolumn chromatography: state of the art. J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 931 A.

- HOLADAY, C.E.; LANSDEN, J. 1975. Rapid screening method for aflatoxin in a number of products. J. Agric. Food. Chem. 23: 1134.
- HOLDER, C.L.; NONY, C.R.; BOWMAN, M.C. 1977. Trace analysis of zearalenone and/or zearalanol in animal chow by high pressure liquid chromatography gas-liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60: 272.
- HOLZAPFEL, C.W.; PURCHASE, I.F.H.; STEYN, P.S.; GOUWS, L. 1966. The toxicity and chemical assay of sterigmatocystin, a carcinogenic mycotoxin, and its isolation from two new fungal sources. S. Afr. Med. J. 40: 1100. Citado em WYLLIE, T.D.; MOREHOUSE, L.H. (eds.) 1978. "Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses" Marcel Dekker, Inc. Nova York. p. 394.
- HORWITZ, W.; KAMPS, L.R.; BOYER, K.W. 1980. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63: 1344.
- HOWELL, M.V.; TAYLOR, P.M. 1981. Determination of Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in mixed feeds, with detection by thin layer chromatography or high pressure liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64: 1356.
- HSIEH, D.P.H.; LIN, M.T.; YAO, R.C. 1973. Conversion of sterigmatocystin to aflatoxin B₁ by Aspergillus parasiticus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52: 992. Citado em SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H. L.; SUTTON, M.D. (eds.) 1985. National Research Council of Canada, Ottawa, Canada, Publicação nº 22848.
- HULT, K.; GATENBECK, S. 1976. A spectrophotometric procedure, using carboxypeptidase A, for the quantitative measurements of ochratoxin A. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59: 128.
- HULT, K.; KOKBY, E.; HAGGLUND, U.; GATENBECK, S.; RUTQVIST, L.; SELLYEY, G. 1979. Ochratoxin A in pig blood: method of analysis and use as a tool for feed studies. Appl. Environ. Microbiol. 38: 772.
- HUNT, D.C.; BOURDON, A.T.; CROSBY, N.T. 1974. Use of high performance liquid chromatography for the identification and estimation of zearalenone, patulin and penicillic acid in food. J. Sci. Fd. Agric. 29: 244.

- HUNT, D.C.; BOURDON, A.T.; WILD, P.J.; CROSBY, N.T. 1978. Use of high performance liquid chromatography combined with fluorescence detection for the identification and estimation of aflatoxins and ochratoxin in food. J. Sci. Fd. Agric. 29: 238.
- HUNT, D.C.; McCONNIE, B.R.; CROSBY, N.T. 1980. Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatisation and high performance liquid chromatography. Analyst. 105: 89.
- HURST, W.J.; LENOVICH, L.M.; MARTIN JR.; R.A. 1982. Liquid chromatographic determination of aflatoxins in artificially contaminated cocoa beans. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65: 888.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. 1971. "Ochratoxin A". IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Lyon, França. vol. 10. Citado em SHANK, R.C. (ed.) 1981. "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks". CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. vol. II, p. 131.
- JARVIS, B. 1971. Factors affecting the production of mycotoxins. J. Appl. Bact. 34: 199.
- JOSEFSSON, E.; MOLLER, T. 1979. High pressure liquid chromatographic determination of ochratoxin A and zearalenone in cereals. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62: 1165.
- JOSEFSSON, B.G.E.; MOLLER, T.E. 1977. Screening method for the detection of aflatoxins, ochratoxins, patulin, sterigmatocystin, and zearalenone in cereals. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60: 1369.
- KAMIMURA, H.; NISHIJIMA, M.; YASUDA, K.; SAITO, K.; IBE, A.; NAGAYAMA, T.; USHIYAMA, H.; NAOI, Y. 1981. Simultaneous detection of several Fusarium mycotoxins in cereals, grains and foodstuffs. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64: 1073.
- KEYL, A.C. 1978. em WYLLIE, T.D.; MOREHOUSE, L.G. (eds.) 1978 "Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses". Marcel Dekker, Inc. Nova York. vol. II p. 9-28.
- KMIECIAK, S. 1976. Determination of aflatoxins in groundnut meals by high performance liquid chromatography. Z. Lebens. Unters.-Forsch. 160: 321.

- KNUTTI, R.; BALZIGER, C.H.; SUTTER, K. 1979. Routine application of HPLC for quantification of aflatoxins in whole peanut kernels. Chromatographia 12: 349.
- KROGH, P. 1977. em RODRICKS, J.U.; HESSELTINE, C.W.; MEHLMAN, M.A. (eds.) 1977. "Mycotoxins in human and animal health" Pathotox Publishers, Inc., Park Forrest South, Illinois. p. 489-498.
- KROGH, P.; HALD, B. 1975. Detection of ochratoxin A in barley, using silica gel minicolumns. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58: 156.
- KROGH, P.; HALD, B.; PEDERSEN, E.J. 1973. Occurrence of ochratoxin and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. Acta Path. Microbiol. Scand. Section B, 81: 695.
- LE TUTOUR, B.; TANTAQUI-ELARAKI, A.; ABOUSSALIM, A. 1984. Simultaneous thin layer chromatographic determination of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in black olives. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67: 611.
- MAJERUS, P.; WOLLER, R. 1983. Zur Mykotoxin-Situation bei Bier. Monatsschrift fur Brauwissenschaft. 36: 335.
- MALAIYANDI, M.; BARRETTE, J.P.; WAVROCK, P.L. 1976. Bis-diazotized benzidine as a spray reagent for detecting zearalenone on thin layer chromatoplates. J. Assoc. Anal. Chem. 59: 959.
- McMILLIAN, M.W.; WILSON, D.M.; MIROCHA, C.J.; WIDSTROM, N.W. 1983. Mycotoxin contamination in grain sorghum from fields in Georgia and Mississippi. Cereal Chem. 60: 226.
- McMILLIAN, M.W.; WILSON, D.M.; WIDSTROM, N.W.; GUELDNER, R.C. 1980. Incidence and level of aflatoxin in preharvest corn in South Georgia in 1978. Cereal Chem. 57: 83.
- MENEZES, T.J.B.; TANGO, J.S.; COELHO, F.A.S.; TEIXEIRA, C.G. 1965/66. Ocorrência do Aspergillus flavus e da aflatoxina em sementes, tortas e farelos de amendoim. Col. ITAL. 1: 559.
- MIGUEL, J.A.; DE ANDRES, V. 1982. Método simple de determinacion simultanea de aflatoxinas, ocratoxina A y zearalenona en productos agricolas. An. INIA/Ser. ganadera. 15: 101.

- MILCZEWSKI, K.E.V.; ENGEL, G.; TEUBER, M. 1981. em REISS, J. (ed.) 1981. "Mycotoxins in Lebensmitteln", Gustav Fischer, Stuttgart, p. 13-84.
- MIROCHA, C.J.; CHRISTENSEN, C.M.; NELSON, G.H. 1971. "F-2 (zearelenone) estrogenic mycotoxins from Fusarium" em "Microbial Toxins", vol. VII, p. 107-138, KADIS, S.; CIEGLER, A.; AJIL, S.J. (eds.), Academic Press, Nova York. Citado em "Mykotoxine in Lebensmitteln", REISS, J. (ed.), 1981, capítulo B, p. 13-84, Gustav Fischer, Stuttgart.
- MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V.; CHRISTENSEN, C.M. 1977. em RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C.W.; MEHLMAN, M.A. (eds.) 1977. "Mycotoxins in human and animal health", Pathotox Publishers, Inc., Park Forrest, Illinois, p. 345-364.
- MIROCHA, C.J.; SCHAUERHAMER, B.; PATHRE, S.U. 1974. Isolation, detection, and quantitation of zearalenone in maize and barley. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 57: 1104.
- MOLLER, T.E.; WARNER, R.M.; FITZPATRICK, D.W. 1978. Rapid, sensitive liquid chromatographic method for determination of zearalenone and zearalenol in wheat. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67: 968.
- NESHEIM, S. 1971. Ochratoxins: occurrence, production, analysis, and toxicity. 85th Ann. Meeting Assoc. Off. Anal. Chem., Washington D.C., Abstr. p. 23. Citado em WYLLIE, T.D.; MOREHOUSE, L.G. (eds.) 1978. "Mycotoxins fungi, mycotoxins, mycotoxicoses" Marcel Dekker, Nova York, p. 28-35.
- NESHEIM, S. 1979. Method of aflatoxin analysis. National Bureau of Standards Special Publication 519.
- NESHEIM, S.; HARDIN, N.F.; FRANCIS, O.J. 1973. Analysis of ochratoxins A and B and their esters in barley, using partition and thin layer chromatography. I. Development of the method. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56: 817.
- NORTHOLT, M.D.; VAN EGMOND, H.P.; PAULSCH, W.E. 1979. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. J. Food Prot. 42: 485.

- NOWOTNY, P.; BALTES, W.; KRONERT, W.; WEBER, R. 1983b. Dunnschicht chromatographische Method zur Bestimmung von 22 Mikotoxinen in verschimmelten Lebensmitteln. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 8: 24.
- NOWOTNY, P.; BALTES, W.; KRONERT, W.; WEBER, R. 1983c. Hochleistungsflussigkeitschromatographische Bestimmung von Ochratoxin A in Weizenkleie. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 8: 29.
- NOWOTNY, P.; BALTES, W.; KRONERT, W.; WEBER, R. 1983a. Untersuchung von Kaseproben des Handels auf die Mycotoxins Sterigmatocystin, Citrinin und Ochratoxin. Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie. 37: 71.
- ORTH, R. 1973. Ein Beitrag zur Okologie und Physiologie von Aspergillus versicolor (Vuillemin) Tiraboschi, Diss. Universitat Heidelberg. Citado em REISS, J. (ed.), 1981. "Mykotoxine in Lebensmitteln" Gustav Fischer, Stuttgart. p. 85-100.
- ORTH, R. 1981. em REISS, J. (ed.) 1981. "Mykotoxine in Lebensmitteln", Gustav Fischer, Stuttgart. p. 85-100.
- OSBORNE, B.G. 1979. Reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A in flour and bakery products. J. Sci. Food Agric. 30: 1065.
- OSBORNE, B.G. 1982. Mycotoxins and the cereal industry - a review J. Fd. Technol. 17: 1.
- PATTERSON, D.S.P.; ROBERTS, B.A. 1979. Mycotoxins in animal feed-stuffs: sensitive thin layer chromatographic detection of aflatoxin, ochratoxin A, sterigmatocystin, zearalenone and T-2 toxin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62: 1265.
- PHILLIPS, T.D.; STEIN, A.F.; IVIE, G.W.; KUBENA, L.F.; HAYES, A.W.; HEIDELBAUGH, N.D. 1983. High pressure liquid chromatographic determination of an o-methyl, methyl ester derivative of ochratoxin A. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66: 570.
- POHLAND, A.E.; THORPE, C.W.; NESHEIM, S. 1979. Newer developments in mycotoxin methodology. Pure Appl. Chem. 52: 213.

POHLAND, A.E.; THORPE, C.W.; NESHEIM, S.; YANG, G. 1981. Advances in mycotoxins methodology, Fourth International Symposium on Toxic Micro Organisms, Tokyo, Japan, October 6-8, 1981. Citado em KURATA, H.; HESSELTINE, C.W. (eds.) 1982. "Control of the microbial contamination of foods and feeds in international trade: microbial standards and specifications". Saikon Publishing Co., Tokyo.

PONS JR., W.A. 1979. High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62: 586.

PONS JR., W.A.; FRANZ JR., A.O. 1977. High performance liquid chromatography of aflatoxins in cottonseed products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60: 89.

PONS JR., W.A.; FRANZ JR., A.O., 1978. High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in peanut products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61: 793.

PRADO, G. 1983. Incidência de aflatoxina B₁ em alimentos. Rev. Farm. Bioquim., Belo Horizonte 5: 147.

PREGNOLATO, W.; SABINO, M. 1969/70. Pesquisa e dosagem de aflatoxinas em amendoim e derivados e em outros cereais. Rev. Adolfo Lutz 29/39: 65.

PRZYBYLSKI, W. 1975. Formation of aflatoxin derivatives on thin-layer chromatographic plates. J. Assoc. Off Anal. Chem. 58: 163.

PURCHASE, I.F.H.; VAN DER WATT, J.J. 1970. Carcinogenicity of sterigmatocystin. Food Cosmetol. Toxicol. 8: 289.

PURCHIO, B.D. 1970. Pesquisa de aflatoxina B₁ e substâncias fluorescentes similares em farinha de trigo. Rev. Microbiol. Escola Paulista de Medicina. 1: 32. Citado em EIROA, M.N.V.; ARCKOLL, D. B. 1978. Investigação de aflatoxinas, patulina e esterigmatocistina em amostras de diversos tipos de farinhas. Bol. ITAL 57: 113.

PURCHIO, A. 1972. Search for B-1 aflatoxin and similar fluorescent compounds in Brazilian cassava-flour. Rev. Microbiol. 3: 121.

PURCHIO, A. 1976. Search for B-1 aflatoxin and similar fluorescent compounds in misso. Mycopathologia 58: 13.

REISS, J. 1976. Mycotoxins in foodstuffs. VI. Formation of sterigmatocystin in bread by Aspergillus versicolor. Z. Lebesm. Unters. Forsch. 160: 313. Citado em REISS, J. (ed.) 1981. "Mykotoxine in Lebensmitteln", Gustav Fischer, Stuttgart. p. 85-100.

REISS, J. 1981. em REISS, J. (ed.) 1981. "Mykotoxine in Lebensmitteln", Gustav Fischer, Stuttgart, p. 199-222.

RIBELIN, W.E. 1978. em WILLIE, T.D.; MOREHOUSE, L.G. (eds.) 1978. "Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxincoses" Marcel Dekker, Inc., Nova York. p. 28-35.

RICHARDSON, K.E.; HAGLER JR., W.M.; HANEY, C.A.; HAMILTON, P. B. 1985. Zearalenone and trichothecene production in soybeans by toxigenic Fusarium. J. Food Prot. 48: 240.

ROBERTS, B.A.; GLANCY, E.M.; PATTERSON, D.S.P. 1981. Rapid, economical method for determination of aflatoxin and ochratoxin in animal feedstuffs. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64: 961.

ROBERTS, B.A.; PATTERSON, D.S.P. 1975. Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs using a novel membrane cleanup procedure. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58: 1178.

ROMER, T.R. 1975. Screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58: 500.

ROMER, T.R.; BOLING, T.M.; MacDONALD, J.L. 1978. Gas-liquid chromatographic determination of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61: 801.

ROMER, T.R.; GHOURI, N.; BOLING, T.M. 1979. Minicolumn screening methods for detection aflatoxin: state of the art. J. Am. Oil. Chem. Soc. 56: 795.

SABINO, M. 1980. Variações de níveis de aflatoxina B₁ em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. Rev. Inst. Adolfo Lutz 40: 153.

- SABINO, M.; CORREA, M.J.S. 1981. Aflatoxina B₁ em feijão. Rev. Inst. Adolfo Lutz 41: 83.
- SABINO, M.; INOMATA, E.J.; LAMARDO, L.C.A. 1982. Variação dos níveis de aflatoxina B₁ em pasta de amendoim e paçoca consumidas no estado de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz 42: 39.
- SANSING, G.A.; LILLEHOJ, E.B.; DETROY, R.W.; MILLER, M.A. 1976. em SHANK, R.C. (ed.) 1981. "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks", CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. vol. II p. 129-136.
- SCHIEFER, H.L. 1985. em SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds.) 1985. "Mycotoxins: a canadian perspective". National Research Council of Canada. Ottawa, Canada. Publicação nº 22848, p. 82-89.
- SCHMIDT, R.; MONDANI, J.; ZIEGENHAGEN, E.; DOSE, K. 1981 High performance liquid chromatography of the mycotoxin sterigmatocystin and its application to the analysis of mouldy rice for sterigmatocystin. J. Chromatogr. 207: 435.
- SCHROEDER, H.W.; KELTON, W.H. 1975. Production of sterigmatocystin by some species of the genus Aspergillus and its toxicity to chicken embryos. Appl. Microbiol. 30: 589. Citado em SHANK, R.C. (ed.) 1981 "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks". CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- SCHULLER, P.L.; HORWITZ, W.; STOLOFF, L. 1976. A review of sampling plans and collaboratively studied methods of analysis for aflatoxins J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59: 1343.
- SCHWEIGHARDT, H.; SCHUH, M.; ABDELHAMID, A.M.; BOHM, J.; LEIBETSEDER, J. 1980. Methods zur Ochratoxin A-Bestimmung in Lebens - und Futtermitteln mittels Hochdruckflussifkeitschromatographie. Z. Lebens. Unters. Forsch. 170: 355.
- SCOTT, P.M. 1982. Assesment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grain products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65: 876.

SCOTT, P.M. 1985. em SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds.) 1985. "Mycotoxins: a canadian perspective". National Research Council of Canada. Ottawa, Canada. Publicação nº 22848, p. 22-24.

SCOTT, P.M. 1985. em SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds.) 1985. "Mycotoxins: a canadian perspective". National Research Council of Canada. Ottawa, Canada. Publicação nº 22848, p. 28-29.

SCOTT, P.M.; HAND, T.B. 1967. Method for detection and estimation of ochratoxin A in some cereal products. J. Assoc. Off Anal. Chem. 50: 366.

SCOTT, P.M.; LAU, P.Y.; KANHERE, S.R. 1981. Gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and other grains. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64: 1364.

SCOTT, P.M.; PANALAKS, T.; KANHERE, S.; MILES, W.F. 1978. Determination of zearalenone in cornflakes and other corn-based foods by thin layer chromatography, high pressure liquid chromatography, and gas-liquid chromatography/high resolution mass spectrometry. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61: 593.

SCOTT, P.M.; VAN WALBEEK, W.; KENNEDY, B.; ANYITI, D. 1972. Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. J. Agr. Food Chem. 20: 1103.

SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. 1985. em SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds.) 1985. "Mycotoxins: a canadian perspective". National Research Council of Canada, Ottawa, Canada. Publicação nº 22848, p. 17-18.

SCUSSEL, V.M. 1984. Estudo da Incidência de aflatoxina em amendoim (Arachis hypogaea L.), milho (Zea mays L.) e produtos derivados. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

SCUSSEL, V.M.; RODRIGUEZ-MAYA, D.B. 1985. Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980-82. Bol. SBCTA; 19: 109.

- SEITZ, L.M.; MOHR, H.E. 1976. Simple method for simultaneous detection of aflatoxin and zearalenone in corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59: 106.
- SEKITA, S.; YOSHIHARA, K.; NATORI, S.; KUWANO, H. 1973. Structures of chaetoglobosin A and B, cytotoxic metabolites of Chaetomium globosum. Tetrahedron Lett. 23: 2109.
- SHANNON; G.M.; SHOTWELL, O.L. 1976. Thin Layer chromatographic determination of sterigmatocystin in cereal grains and soybeans. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59: 963.
- SHOTWELL, O.L.; GOULDEN, M.L.; BENNETT, G.A.; PLATTNER, R.D.; HESSELTINE, C.W. 1977. Survey of 1975 wheat and soybeans for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60: 778.
- SHOTWELL, O.L.; BENNETT, G.A.; GOULDEN, M.D.; PLATTNER, R.D.; HESSELTINE, C.W. 1980. Survey for zearalenone, aflatoxin, and ochratoxin in U.S. grain sorghum from 1975 and 1976 crops. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63: 922.
- SHOTWELL, O.L.; GOULDEN, M.L.; HESSELTINE, C.W. 1976. Survey of U.S. wheat for ochratoxin and aflatoxin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59: 122.
- SHOTWELL, O.L.; HESSELTINE, C.W.; VANDERGRAFT, E.E.; GOULDEN, M.L. 1971. Survey of corn from different regions for aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. Cereal Sci. Today 16: 266.
- SPICHER, G. 1981. em REISS, J. (ed.) 1981. "Mykotoxine in Lebensmitteln" Gustav Fischer, Stuttgart. p- 243-434.
- STACK, M.E.; NESHEIM, S.; BROWN, N.L.; POHLAND, A.E. 1976. Determination of sterigmatocystin in corn and oats by gel permeation and high pressure liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59: 966.
- STACK, M.E.; POHLAND, A.E. 1975. Collaborative study of a method for chemical confirmation of the identity of aflatoxin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58: 110.

STACK, M.; RODRICKS, J.V. 1971. Method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 54: 86.

STEYN, P.S.; VAN DER MERWE, K.J. 1966. Detection and estimation of ochratoxin A. Nature 211: 1180.

STOB, M.; BALDWIN, R.S.; TUIRE, J.; ANDREWS, F.N.; GILLETTE, K.G. 1962. Isolation of an anabolic uterotrophic compound from corn infected with Gibberella zeae. Nature (London) 196: 1318. Citado em SHANK, R.C. (ed.) 1981. "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks", CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. vol. II, p. 145-154.

STOLOFF, L. 1979. The three eras of fungal toxins research. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 784.

STOLOFF, L. 1982. em STICH, H.F. (ed.) 1982. "Carcinogens and mutagens in the environmental" CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. vol. I, p. 97-120.

STOLOFF, L. 1983. Report on mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66: 355.

STOLOFF, L.; HENRY, S.; FRANCIS JR., O.J. 1976. Survey for aflatoxins and zearalenone in 1973 crop corn stored on farms and in country elevators. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59: 118.

STOLOFF, L.; NESHEIM, S.; YIN, L.; RODRICKS, J.V.; STACK, M. 1971. A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin, and patulin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 54: 91.

STOLOFF, L.; SCOTT, P.M. 1984. em WILLIAMS, S. (ed.) 1984. "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", A.O.A.C. Arlington, Virginia. 14ª edição, p. 477-500.

STUBBLEFIELD, R.D. 1979. em TOUCHSTONE, J.C.; SHERMA, J. (eds.) 1979. "Densitometry in thin layer chromatography", John Wiley and Sons, Nova York. p. 393-429.

TAKEDA, Y.; ISOHATA, E.; AMANO, R.; UCHIYAMA, M. 1979. Simultaneous extraction and fractionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins in grains. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62: 573.

TANGO, J.S.; MENEZES, T.J.B.; TEIXEIRA, C.G. 1965/66. Levantamento da ocorrência de aflatoxina em sementes de amendoim nas safras de águas e da seca. Col. ITAL 1: 1.

TARTER, E.J.; HANCHAY, J.P.; SCOTT, P.M. 1984. Improved liquid chromatography method for determination of aflatoxins in peanut butter and other commodities. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67: 597.

THEAN, J.E.; LORENZ, D.R.; WILSON, D.W.; RODGERS, K.; GUELDNER, R. C. 1980. Extraction, cleanup, and quantitative determination of aflatoxins in corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63: 633.

THOMAS, F.; EPPLEY, R.M.; TRUCKSESS, M.W. 1975. Rapid screening method for aflatoxins and zearalenone in corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58: 114.

TRENHOLM, H.L.; THOMPSON, B.K.; STANDISH, J.F.; SEAMAN, W.L. 1985. em SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds.) 1985. National Research Council of Canada, Ottawa, Canada. Publicação nº 22848. p. 43-48.

TRENHOLM, H.L.; WARNER, R.M.; FITZPATRICK, D.W. 1984. Rapid, sensitive liquid chromatographic method for determination of zearalenone and α - and β -zearalenol in wheat. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67: 968.

UDAGAWA, S.; MUROI, T.; KURATA, H.; SEKITA, S.; YOSHIHARA, K.; NATORI, S.; UMEDA, M. 1976b. The production of chaetoglolosins, sterigmatocystin, o-methylsterigmatocystin, and chaetocin by Chaetomium spp. and related fungi Can. J. Microbiol. 25: 170. Citado em SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds.) 1985. "Mycotoxins: a canadian perspective". National Research of Canada. Ottawa, Ontario, p. 24.

UDAGAWA, S.; MUROI, T.; KURATA, H.; SEKITA, S.; YOSHIMIRA, K.; NATORI, S. 1979a. Chaetomium dagawae: a neo producer of sterigmatocystin. Trans. Mycol. Soc. Jpn. 20: 475. Citado em SCOTT, P.M.;

- TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds.) 1985. "Mycotoxins: a canadian perspective". National Research Council of Canada. Ottawa, Ontario. p. 24.
- VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L. 1965. Mycotoxins: Part II. The constitution of ochratoxins A, B and C, metabolites of Aspergillus ochraceus Wilh. J. Chem. Soc. 7083.
- VAN DER WATT, J.J.; PURCHASE, I.F.M. 1970. The acute toxicity of retrosine, aflatoxine and sterigmatocystin in vervet monkeys. Br. J. Exp. Pathol. 51: 183. Citado em WILLIE, T.D.; MOREHOUSE, L.G. 1978. "Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses". Marcel Dekker, Inc. Nova York. p. 333-488.
- VAN EGMOND, H.P.; PAULSCH, W.E.; SIZOO, E.A.; SCHULLER, P.L. 1979. Rijksinstituut voor Volksgezondheid, Report nº 152/79 LCO. Citado em STEYN, P.S. 1981. Multimycotoxin analysis. Pure Appl. Chem. 53: 892.
- VELASCO, J. 1972. Detection of Aflatoxin using small columns of florisil. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 49: 141.
- VESONDER, R.F.; HORN, B.W. 1985. Sterigmatocystin in dairy cattle feed contaminated with Aspergillus versicolor. Appl. Environ. Microbiol. 49: 234.
- WARE, F.M.; THORPE, C.W. 1978. Determination of zearalenone in corn by high pressure liquid chromatography and fluorescence detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61: 1058.
- WHIDDEN, M.P.; DAVIS, N.D.; DIENER, U.L. 1980. Detection of rubra-toxin B and seven other mycotoxins in corn. J. Agric. Food Chem. 28: 784.
- WHITAKER, T.B.; DICKENS, J.W.; MONROE, R.J. 1979. Variability associated with testing corn for aflatoxin. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 789.
- WHITAKER, T.B.; WHITTEN, M.E. 1976. Variability associated with testing cottonseed for aflatoxin. J. Am. Oil Chem. Soc. 53: 502.

- WILLIAMS, B.C. 1985. em SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.L.; SUTTON, M.D. (eds.) 1985. "Mycotoxins: a canadian perspective", National Research Council of Canada, Ottawa, Canada. p. 49-54.
- WILSON, B.J. 1978. "Hazards of mycotoxins to public health". J. Food Protec. 41: 375.
- WILSON, D.M.; TABOR, W.H.; TRUCKSESS, M.W. 1976. Screening method for the detection of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, penicillic acid, and citrinine. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59: 125.
- WOGAN, G.N.; EDWARDS, G.S.; NEWBERNE, P.M. 1971. Structure activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. Cancer Res. 31: 1936. Citado em SHANK, R.G. (ed.) 1981. "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks". CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. vol. II, p. 3-28.
- WOGAN, G.N. 1973. Aflatoxin carcinogenesis. Methods Cancer Res. 7: 309. Citado em SHANK, R.G. (ed.) 1981. "Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks". CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. vol. II, p. 3-28.
- WOLLER, R. 1981. em REISS, J. (ed.) 1981. "Mykotoxine in Lebensmitteln", Gustav Fischer, Stuttgart. p. 143-170.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Délia Rodriguez-Amaya, pela orientação desta tese, pelo estímulo e pela constante e gentil disponibilidade para a troca de idéias.

Ao Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan, pela coordenação do projeto "Incidência, determinação e fatores de controle de micotoxinas em alimentos brasileiros" (FINEP) que possibilitou o início do trabalho desta tese.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo auxílio financeiro fornecido durante o desenvolvimento do método de triagem e quantificação de ocratoxina A.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro que possibilitou o desenvolvimento do método de determinação simultânea de aflatoxinas, zearaleno, esterigmatocistina e ocratoxina A, assim como a realização do levantamento da incidência de micotoxinas em alimentos comercializados na região de Campinas, no período de maio/1985 a junho/1986.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa, pela bolsa de pesquisa outorgada a autora deste trabalho.

A Myrna Sabino, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz, pela doação de amostras de milho contaminadas com zearalenona e pela análise das mesmas pelo método da A.O.A.C. (1984).

A Luciene Venturelli, então técnica do DEPAN (FEA), pela determinação de aflatoxinas em uma amostra de arroz contaminado e análise de 117 amostras do levantamento, pelo método de Romer (1975).

Aos Profs. Drs. Felix Reyes Reyes, Adhemar Purchio, Antonio de Melo Serrano e Marilene Penteado, pelas sugestões apresentadas para a redação final da tese.

À Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos, pela colaboração na impressão da tese.