

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

ALINE MUNHOZ LUCAS

**FUMONISINA: INCIDÊNCIA EM AMOSTRAS
BRASILEIRAS E METODOLOGIA ANALÍTICA**

BAURU

2009

ALINE MUNHOZ LUCAS

**FUMONISINA: INCIDÊNCIA EM AMOSTRAS
BRASILEIRAS E METODOLOGIA ANALÍTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao centro de Ciências Exatas
e Naturais como parte dos requisitos para a
obtenção do título de bacharel em Química,
sob orientação da Prof^a. Dr^a. Eliane Maria
Ravasi Stéfano Simionato

BAURU

2009

ALINE MUNHOZ LUCAS

**FUMONISINA: INCIDÊNCIA EM AMOSTRAS BRASILEIRAS E
METODOLOGIA ANALÍTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao centro de Ciências Exatas e Naturais como parte dos requisitos para a obtenção do título de bacharel em química, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato
Universidade do Sagrado Coração

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Cerino Coltinho
Universidade do Sagrado Coração

Prof.^a Ms. Setsuko Sato
Universidade do Sagrado Coração

Data: 21/11/09

Dedico este trabalho a minha mãe, meus irmãos e ao Eduardo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, a Professora Doutora Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato o meu agradecimento pelos ensinamentos transmitidos, pela exigência e pela confiança que depositou em mim.

Aos professores da USC pelo conhecimento adquirido nesses seis anos.

À Tatiana Alonso Lunardi Casoto e Rosa Maria de Oliveira Rosa, do Laboratório de Análise de Alimentos, onde faço estágio, pelo incentivo, aprendizado e pelos bons momentos passados durante o meu estágio.

À minha mãe por sempre apoiar minhas decisões, me dar força em todos os momentos e por ter me dado o melhor que pode, por ser a melhor mãe do mundo.

Aos meus lindos irmãos, o meu agradecimento pela compreensão e paciência que tiveram em alguns momentos difíceis, por sempre me incentivarem, pela ajuda em vários trabalhos e por serem as melhores pessoas do mundo.

Ao Eduardo o meu agradecimento por sempre estar ao meu lado, pela compreensão e paciência e principalmente pelo carinho e amor.

À Deus pela oportunidade de poder terminar mais uma etapa.

“Tenha confiança em suas capacidades, e
caminhe sem temer os obstáculos.”

C. Torres Pastorino

RESUMO

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza e são contaminantes comuns de alimentos, grãos e rações. A presença desses fungos causa a perda de qualidade do produto e produz compostos tóxicos, chamados de micotoxinas. As micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por alguns fungos denominados fungos toxigênicos, os quais podem provocar intoxicações em seres humanos e animais. A fumonisina é um tipo de micotoxina que ataca principalmente o milho, e é produzida por fungos *Fusarium verticillioides*. São fungos patogênicos para as plantas do milho, infectando raízes e espigas causando podridão, bem como a deterioração de grãos armazenados. A contaminação de alimentos e compostos com fumonisinas tem sido associada a várias doenças em animais e humanos. Desde a descoberta das micotoxinas e sua caracterização em 1988, houve um progresso significativo nos métodos analíticos usados para detectá-las. A grande maioria dos métodos referenciados envolve extração, recorrendo a misturas de solventes polares, seguido de um processo de purificação com extração em fase sólida (SPE) em colunas de fase reversa, colunas de troca iônica forte (SAX) ou colunas de imunoafinidade (IAC). Os métodos desenvolvidos para proceder às análises quantitativas e qualitativas de toxinas incluem cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-MS), cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS), cromatografia de gasosa-espectroscopia infravermelho (CG-IV). Além de metodologia química, os imunoenaios, representados por “enzyme linked immunosorbent assay” – ELISA e imunoafinidade vêm sendo muito empregados. Considerando a elevada contaminação de milho por *Fusarium verticillioides* e a produção de fumonisinas pelos mesmos, aliada aos sérios riscos à saúde humana e animal, este estudo objetivou um levantamento bibliográfico sobre a contaminação por fumonisina B₁ em alimentos brasileiros, bem como mostrar quais as metodologias empregadas para a determinação dessa micotoxina, e seus critérios de validação.

Palavras-chave: Micotoxina. Fumonisina. Milho. Cromatografia.

ABSTRACT

Fungi are widely distributed in nature and are common contaminants of food, grain and feed. The presence of these fungi cause the loss of product quality and produces toxic compounds called mycotoxins. Mycotoxins are toxic metabolites produced by certain fungi called toxigenic fungi, which can cause poisoning in humans and animals. Fumonisin is a type of mycotoxin that affects mainly maize, this toxin is produced by the fungus *Fusarium moniliforme*. These fungi are pathogenic to maize plants, infecting roots and ears causing rot and deterioration of stored grains. Contamination of food and compounds with fumonisins has been associated with several diseases in animals and humans. In horses leads to the development of periventricular leukoencephalomalacia (LEME), in pigs cause pulmonary edema (PPE) in humans has been associated with esophageal cancer (EC). Since the discovery of mycotoxins and their characterization in 1988, there was significant progress in analytical methods used to detect them. Most of the methods referenced involves extraction, using mixtures of polar solvents, followed by purification with solid phase extraction (SPE) columns in reversed-phase columns of strong cation exchange (SAX) or immunoaffinity columns (IAC). The methods developed to carry out quantitative and qualitative analysis of toxins include high performance liquid chromatography (HPLC), thin layer chromatography (TLC), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), gas chromatography-infrared spectroscopy (GC-IV). In addition to chemical methods, immunoassays, represented by "enzyme linked immunosorbent assay - ELISA and immunoaffinity have been widely used. Considering the high contamination of corn by *Fusarium verticillioides* and fumonisins production by them, coupled with serious risks to human and animal health, this study aimed to survey the fumonisin B₁ in Brazilian foods, and to show what methodologies used for determining such a mycotoxin, and its validation criteria.

Key-words: Mycotoxin. Fumonisin. Corn. Chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmula estrutural das fumonisinas B ₁ , B ₂ e B ₃	22
Figura 2 - Cérebro. Observa-se extensa área de malácia no encéfalo direito, caracterizada por áreas amareladas (edema) ou hemorrágicas e cavitações da substância branca.	24
Figura 3 - Esquema representativo da purificação com colunas de imunoafinidade.	32
Figura 4 - Cartuchos para extração em fase sólida	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Importantes fungos e micotoxinas encontrados em grão e rações animais.....	15
Tabela 2 - Legislação para micotoxinas em alimentos e rações nos diferentes continentes.	17
Tabela 3 - Ocorrência das fumonisinas em diversos países.....	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
3 DESENVOLVIMENTO	14
3.1 MICOTOXINAS	14
3.2 TOXICIDADE DAS MICOTOXINAS	16
3.3 FUMONISINAS	21
3.4 TOXICIDADE DAS FUMONISINAS	24
3.5 OCORRÊNCIA MUNDIAL	26
3.6 OCORRÊNCIA NO BRASIL	27
3.7 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA MICOTOXINAS	29
3.8 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA FUMONISINAS	30
3.8.1 Amostragem	30
3.8.2 Extração	31
3.8.3 Limpeza	32
3.8.4 Derivatização	33
3.8.5 Detecção e Quantificação	34
3.8.6 Confirmação	37
4 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza e são contaminantes comuns de alimentos, grão e rações, que por apresentarem nutrientes como carboidratos, proteínas e lipídios constituem um substrato adequado para o desenvolvimento de microrganismos (GOURAMA; BULLERMEN, 1995).

Certos fungos, freqüentemente encontrados em grãos, têm a capacidade de produzir metabólitos secundários capazes de causar alterações tóxicas, mutagênicas, teratogênicas ou carcinogênicas em animais e humanos.

Os efeitos do crescimento fúngico incluem diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloramento, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, mudanças químicas e nutricionais, perda de qualidade e produção de compostos tóxicos, as micotoxinas (POMERANS, 1982).

Micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por alguns fungos denominados fungos toxigênicos (ADOLFO LUTZ, 2005), os quais podem provocar intoxicações em seres humanos e animais.

As micotoxinas são produzidas quando certas condições ambientais, como temperatura e umidade, são propícias para a sua produção, além das características bioquímicas, integridade física do cereal, material mal armazenado ou processamento inadequado, que tornam os cereais suscetíveis à proliferação de fungos (ADOLFO LUTZ, 2005).

As principais micotoxinas da cultura do milho são as fumonisinas (RICHARD, 2007), toxinas estas produzidas principalmente por fungos do gênero *Fusarium* (CHEN et al., 1992; RHEEDER et al., 2002). As fumonisinas, foram descritas pela primeira vez em 1988, e desde então foram identificados 6 membros distintos do grupo das fumonisinas: FB₁, FB₂, FB₃, FB₄, FA₁ e FA₂, porém as mais tóxicas e estudadas são as B₁, B₂ e B₃ (SCUSSEL, 1998).

As fumonisinas contaminam o milho e seus derivados em nível mundial. São fungos patogênicos para as plantas de milho, infectando raízes e espigas causando podridão, assim como a deterioração de grãos armazenados.

O nome fumonisina deriva de *Fusarium moniliforme* (atualmente denominado *F. verticillioides*), de onde o primeiro membro desta classe de compostos tóxicos, a fumonisina B₁, foi caracterizado. Trata-se de um diéster de propano-1,2,3-ácido

tricarboxílico e 2-amino-12,16-dimetil, 3,5,10,14,15-pentahidroieicosano (DESJARDINS, 2006). Elas são moléculas fortemente polares, solúveis em água e acetonitrila e insolúveis em solventes orgânicos (POZZI et al., 2002).

A FB₁ é a fumonisina mais encontrada e em maiores níveis, sendo responsável por 70 a 80% do total de fumonisinas (RHEEDER et al., 2002).

A alta qualidade nutricional expõe o milho à contaminação por microrganismos, principalmente fungos micotoxigênicos como *Fusarium verticillioides* (SYDENHAM; SHEPAR, 1996), que tem sido alvo de intensa investigação devido à elevada frequência em milho e derivados (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

A contaminação de alimentos com fumonisina tem sido associada a várias doenças, quer em animais quer em humanos. As manifestações clínicas que decorrem das toxicoses provocadas pelas fumonisinas, bem como os órgãos atingidos variam de espécie para espécie. Nos cavalos conduzem o aparecimento de leucoencéfalomalácia (LEME), em suínos provocam edema pulmonar. Em ovelhas, ratos e coelhos induzem a toxicidade renal, sendo também hepatotóxicas para os segundos. Também tem sido epidemiologicamente relacionadas com o câncer de esôfago em humanos (MEYER et al., 2003).

O Brasil é o terceiro produtor mundial de milho, com uma produção anual de 52,32 milhões de toneladas, sendo o estado do Paraná responsável por 26,5% da produção nacional e cerca de 80% das exportações de milho do Brasil (IBGE, 2009). Cerca de 66% do milho produzido no país é destinado à fabricação de ração animal, enquanto 20% é utilizado para consumo humano direto, como fubá, farinha de milho, flocos de milho, principalmente em propriedades rurais e 8% é destinado à indústria (FIGUEIRA et al., 2003).

A grande maioria dos métodos analíticos referenciados para análise de fumonisinas envolve extração, seguida de um processo de purificação e concentração (LINO et al., 2006). A detecção e quantificação são efetuadas principalmente recorrendo a métodos cromatográficos. O desenvolvimento de métodos imunológicos, como “enzyme – linked immunosorbent assay” (ELISA), tem permitido análises mais rápidas.

2 OBJETIVOS

Considerando a elevada contaminação do milho por *F. verticillioides* e a produção de fumonisinas pelos mesmos, aliada aos sérios riscos à saúde humana e animal, este estudo objetivou um levantamento bibliográfico sobre a contaminação de fumonisina B₁ em alimentos brasileiros, bem como mostrar quais as metodologias empregadas para determinação dessa micotoxina, e seus critérios de validação.

3 DESENVOLVIMENTO

A seguir são discutidos aspectos relevantes sobre as micotoxinas, suas ocorrências, toxicidade e metodologia analítica, com ênfase nas fumonisinas.

3.1 MICOTOXINAS

A história das micotoxinas começa em 1960, quando um surto de mortalidade inexplicável de aves aconteceu no Reino Unido. Este surto ficou conhecido mundialmente como “Doença X dos Perus”. Após investigação científica, descobriu-se que o problema estava na ração, feita com amendoim importado da África e do Brasil. Este amendoim estava contaminado com uma substância produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, a aflatoxina. Desta ração foi obtido um extrato clorofórmico, que ao ser administrado a marrecos jovens, foi capaz de produzir lesões hepáticas semelhantes à doença original (ALLCROFT; CARNAGHAN; SARGENT, 1961; ALLCROFT; CARNAGHAN, 1962).

O termo micotoxina é originário de uma palavra grega “mykes” (fungos) e de uma palavra do latim “toxicum” (toxina). A expressão greco-latina “mykes toxicum” significa toxina fúngica, ou como, dizemos, micotoxina (LAZZARI, 1997).

Micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por alguns fungos denominados de fungos toxigênicos, sendo os principais representantes os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Entre as principais micotoxinas de interesse na área de alimentos citamos: aflatoxinas, patulina, ocratoxina, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas entre outras (ADOLFO LUTZ, 2005).

As micotoxinas são produzidas somente quando certas condições ambientais, tais como temperatura e umidade, além das características bioquímicas dos produtos que servem como substrato, são propícias para a sua produção (ADOLFO LUTZ, 2005).

Outro fator muito importante na produção das micotoxinas é a integridade física do cereal. A contaminação poderá ocorrer mesmo em material armazenado, por lesões mecânicas ou provocadas por insetos ou durante o processamento, tornando os cereais muito susceptíveis à proliferação de fungos (ADOLFO LUTZ, 2005).

As micotoxinas deterioram os grãos ou a ração, reduzindo sua palatabilidade. A deterioração fúngica provoca danos no germe dos grãos, descoloração, alteração nutricional e perda de matéria seca (LAZZARI, 1997).

A presença de micotoxina está principalmente associada a grão como amendoim, pistache, nozes, castanha, semente de algodão, milho, trigo, soja, arroz, feijão, cacau, sorgo, centeio, café, cevada, entre outras, mas também podem ser encontrados em frutas, leites e produtos lácteos, ovos, produtos cárneos curados e embutidos, frutas secas, chás e pimentas (DINIZ, 2002). A Tabela 1 apresenta dados sobre os fungos produtores de diferentes micotoxinas, os alimentos envolvidos e as espécies afetadas.

Tabela 1 - Importantes fungos e micotoxinas encontrados em grão e rações animais.

Fungos	Micotoxina	Alimento afetado	Esp. Afetadas	Referência
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxina	Milho, amendoim, farelo de algodão e sorgo	Todas as espécies, incluindo homem	BRUERTON, 2001
<i>Aspergillus Penicillium</i>	Ochratoxina	Milho, cereais e arroz	Principalmente suínos e aves	HURBURGH, 1995
<i>Aspergillus Penicillium</i>	Ácido ciclopiazonico	Cereais, amendoim e milho	Suínos e aves	SUKSUPAHT et al., 1989
<i>Fusarium</i>	Deoxinivaleno	Cereais e milho	Suínos e aves	NEWMAN, 2000b
<i>Fusarium</i>	T-2	Cereais e semente de oleaginosas	Aves	NEWMAN, 2000b
<i>Fusarium</i>	Zearalenona	Milho, feno, gramíneas, grãos	Suínos e ruminantes	NEWMAN, 2000b
<i>Fusarium</i>	Fumonisin	Milho, grão	Eqüinos, suínos e aves	NEWMAN, 2000b
<i>Claviceps</i>	Ergot	Sorgo	Todas as espécies	BRUERTON, 2001
<i>Alternaria</i>	Ácido tenuozóico	Cereais e frutas	Todas as espécies	BRUERTON, 2001

Fonte: Jobim et al., 2001.

3.2 TOXICIDADE DAS MICOTOXINAS

As micotoxinas podem causar doenças e mortes, quando ingeridas pelo homem ou pelos animais. As doenças causadas são denominadas micotoxicoses (LAZZARI, 1997).

A micotoxicose pode causar ao organismo do animal e do ser humano vários danos no crescimento, afetando funções do organismo, desenvolvendo tumores, podendo inclusive, ser letal. A contaminação de alimentos com bolores pode ocasionar, além de problemas de saúde, perdas consideráveis do ponto de vista econômico (SCUSSEL, 1998).

A ocorrência natural de micotoxinas em cereais, além dos problemas de saúde, pode ter implicações econômicas importantes para diversos setores comerciais, incluindo produtores de grão, criadores de animais, assim como processadores de alimentos e rações (PETSKA; ABOUZEID; SUTKINO, 1995).

O impacto das micotoxinas sobre a saúde depende da quantidade total de micotoxina ingerida, toxicidade do composto, presença de outras micotoxinas, características individuais como peso corporal e interferências da dieta. Das micotoxinas conhecidas cerca de 20 ocorrem em gêneros alimentícios em frequência e níveis significativos na segurança alimentar. (STEYN, 1995).

Legislações têm sido adotadas em muitos países com o intuito de proteger os consumidores contra os efeitos nocivos das micotoxinas em alimentos in natura e processados, e até mesmo em rações para animais de abate e de estimação. A Tabela 2 mostra legislações para micotoxinas em alimento e rações.

Informações até o ano de 2003 demonstram que cerca de 100 países já dispõem de legislação para regulamentar os limites de micotoxinas em alimentos e rações. Isso representa um acréscimo de 30% em relação ao ano de 1995. Os países cobertos por essas legislações englobam aproximadamente 90% da população mundial (FAO, 2003).

Tabela 2 - Legislação para micotoxinas em alimentos e rações nos diferentes continentes.

Continente	Micotoxina	Substrato/limite
África		Para todos os alimentos: B1: 5 ppb; B1+B2+G1+G2: 10 ppb
		Amendoim para exportação: B1:5 ppb
	Afl. B1 ⁽³⁾	Amendoim e seus produtos; óleos vegetais:
	Afl. G1 ⁽¹⁾	B1+B2+G1+G2:20 ppb
	Afl. B1+G1 ⁽²⁾	Alimentos infantis: B1:0 ppb
	Afl. M1 ⁽¹⁾	Leite fluido: M1:1 ppb
	Afl. B1+B2+G1+G2 ⁽³⁾	Rações: B1: 50 ppb
	Ocratoxina A ⁽³⁾	Produtos de amendoim como ração:B1: 50 ppb
	Patulina ⁽¹⁾	Produtos de amendoim como ingredientes para ração: B1: 300 ppb
	Zearalenona ⁽³⁾	Amendoim, milho e sorgo: B1: 5 ppb; G1: 4 ppb
	Rações para aves: B1: B+G1: 10 ppb	
	Farinha de arroz: B1: 5 ppb; G1: 4 ppb	

Tabela 2 - Legislação para micotoxinas em alimentos e rações nos diferentes continentes (continuação).

Continente	Micotoxina	Substrato/limite
Ásia/Oceania		Todos os alimentos: B1+B2+G1+G2: 5 ppb
		Fomopsinas: 5 ppb
		Manteiga de amendoim, nozes em geral: B1+B2+G1+G2: 15 ppb
		Nozes e seus produtos: B1+B2+G1+G2: 20 ppb
	Ácido agárico ⁽¹⁾	Castanha-do-brasil: B1+B2+G1+G2: 15 ppb
	Afl. B1 ⁽³⁾	Arroz, óleos comestíveis: B1: 10 ppb
	Afl. M1 ⁽¹⁾	Aveia, cevada, feijão, sorgo, trigo, outros grãos e alimentos fermentados: B1: 20 ppb
	Afl. B1+B2+G1+G2 ⁽³⁾	Leite fluido e produtos lácteos: B1: 0,5 ppb
	Diacetoxiscirpenol ⁽¹⁾	Amendoim e produtos: B1+B2+G1+G2+M1+M2: 20 ppb
	Desoxinivalenol ⁽²⁾	Todos alimentos: 30 ppb
	Fomopsinas ⁽¹⁾	Farelo de amendoim para exportação: B1: 120 ppb
	Fumonisina B1 ⁽¹⁾	Rações: B1: 10 ppb
	Fumonisina B1+B2 ⁽¹⁾	Manteiga de amendoim, amendoim em grão, nozes: B1+B2+G1+G2 : 15 ppb
	Ocratoxina A ⁽³⁾	Alimentos para crianças até 3 anos de idade: B1+B2+G1+G2: 1 ppb
	Patulina ⁽¹⁾	Rações: B1: 1000 ppb
	T2 ⁽³⁾	Copra em ração para vacas, porcos, marrecos, ovinos: B1+B2+G1+G2: 1.000 ppb
Zearalenona ⁽³⁾	Farelos de amendoim, de gergelim, de colza, mandioca em ração de frangos: B1+B2+G1+G2: 200 ppb	

Tabela 2 - Legislação para micotoxinas em alimentos e rações nos diferentes continentes (continuação).

Continente	Micotoxina	Substrato/limite	
América Latina		Alimentos: B1+B2+G1+G2: 20 ppb Amendoim com ou sem casca, cru ou tostado, pasta e manteiga de amendoim: B1+B2+G1+G2: 2 ppb Milho em grão, farelo de milho, farinha e sêmolos: B1+B2+G1+G2: 20 ppb	
	Alcalóides ergóticos ⁽²⁾	Leite fluido : M1: 0,5 ppb	
	Afl. B1 ⁽³⁾	Leite em pó: M1: 5 ppb	
	Afl. B1+G1 ⁽¹⁾	Alimentos infantis: B1:0 ppb	
	Afl. M1 ⁽¹⁾	Leite fluido e em pó: M1: 0,05 ppb	
	Afl. B1+B2+G1+G2 ⁽³⁾	Produtos lácteos: M1: 0,5 ppb	
	Desoxinivalenol ⁽³⁾	Alimentos e especiarias: B1+B2+G1+G2: 20 ppb	
	Fumonisina B1 ⁽¹⁾	Produtos de soja, amendoim, frutas secas: B1+B2+G1+G2: 30 ppb	
	Ocratoxina A ⁽¹⁾	Cacau em grão: B1+B2+G1+G2: 10 ppb	
	Patulina ⁽¹⁾	Alimentos infantis industrializados: B1+B2+G1+G2: 3 ppb	
	Zearalenona ⁽³⁾	Milho e cevada: Zearalenona: 200 ppb Sucos de frutas: Patulina: 50 ppb Arroz, café, cevada e milho: Ocratoxina A: 50 ppb Rações: B1: 20ppb; B1+B2+G1+G2: 50 ppb Farinha de arroz: B1+B2+G1+G2: 5 ppb	
	América do Norte	Alcalóides ergóticos ⁽²⁾	Alimentos: B1+B2+G1+G2: 20 ppb
		Afl. M1 ⁽¹⁾	Nozes e produtos: B1+B2+G1+G2: 15 ppb
Afl. B1+B2+G1+G2 ⁽³⁾		Alimentos prontos de trigo: Desoxinivalenol: 1.000 ppb	
Diacetoxiscirpenol ⁽²⁾		Trigo mole: Desoxivalenol: 2.000 ppb	
Desoxinivalenol ⁽³⁾		Laticínios: M1: 0,5 ppb	
Fumonisina 1+B2+B3 ⁽³⁾		Rações: B1+B2+G1+G2: 20 ppb	
HT2 ⁽²⁾		Rações para gado e aves: Desoxinivalenol: 5.000 ppb	
Ocratoxina A ⁽²⁾		Toxina HT2: 100 ppb	
Patulina ⁽¹⁾		Rações para porcos, novilhas e animais em lactação: Desoxinivalenol: 1.000 ppb	
T2 ⁽²⁾	Toxina HT2: 25 ppb		

Tabela 2 - Legislação para micotoxinas em alimentos e rações nos diferentes continentes (continuação).

Continente	Micotoxina	Substrato/limite
Europa		Todos os alimentos: B1: 0 ppb
		Todos os alimentos: B1: 10 ppb
		Todos os alimentos: B1+B2+G1+G2: 5 ppb; Patulina: 50 ppb
		Alimentos para crianças e jovens: B1+B2+G1+G2: 0,05 ppb; M1: 0,05 ppb
		Leite: M1: 0,05 ppb
		Amendoim, nozes e frutas secas para consumo direto ou como ingredientes de alimentos: B1: 2 ppb; B1+B2+G1+G2: 4 ppb
	Afl. B1 ⁽³⁾	
	Afl. B1+G1 ⁽³⁾	Nozes e frutas secas submetidas a seleção ou a tratamento físico: B1: 5ppb; B1+B2+G1+G2: 10 ppb
	Afl. M1 ⁽¹⁾	
	Afl. B1+B2+G1+G2 ⁽³⁾	Cereais e produtos processados para consumo direto ou como ingrediente de alimentos: B1: 2 ppb; B1+B2+G1+G2: 4 ppb
	Diacetoxiscirpenol ⁽²⁾	
	Desoxinivalenol ⁽³⁾	Produtos derivados de cereais para consumo direto: Ocratoxina A: 3 ppb; Zearalenona: 100 ppb
	Fumonisina B1 ⁽¹⁾	
	Fumonisina B1+B2 ⁽¹⁾	Cereais crus: Ocratoxina A: 5 ppb; Frutas secas: Ocratoxina A: 10 ppb
	Ocratoxina A ⁽³⁾	Castanha-do-brasil: B1+B2+G1+G2: 4 ppb
Patulina ⁽¹⁾	Especiarias e temperos: B1: 5 ppb; B1+B2+G1+G2: 10 ppb	
Esterigmatocistina ⁽¹⁾	Cerveja: Ocratoxina A: 0,2 ppb	
T2 ⁽³⁾	Ervas para chás: B1: 5 ppb; B1+B2+G1+G2: 10 ppb	
Zearalenona ⁽³⁾	Leite in natura ou destinado à produção de produtos lácteos, e leite tratado termicamente: M1: 0,05 ppb	
	Sucos de maçã e de outras frutas: Patulina: 50 ppb	
	Complementos para rações em geral: B1: 5 ppb	
	Produtos de amendoim, algodão, babaçu, copra, palma e milho: B1: 20 ppb	
	Complementos de rações para gado, caprinos e ovinos, exceto para animais em lactação, cordeiros, cabritinhos e novilhos: B1: 50 ppb	

Fonte: Embrapa, 2007.

(1)Micotoxina com legislação apenas para alimentos.

(2)Micotoxina com legislação apenas para rações.

(3)Micotoxina com legislação tanto para alimentos quanto para rações.

Desde 1960, a micotoxicologia tem sido desenvolvida e novas micotoxinas vem sendo isoladas e caracterizadas, especialmente as produzidas pelo gênero *Fusarium*, dentre as quais se destacam as fumonisinas, consideradas de ocorrência e importância mundial.

3.3 FUMONISINAS

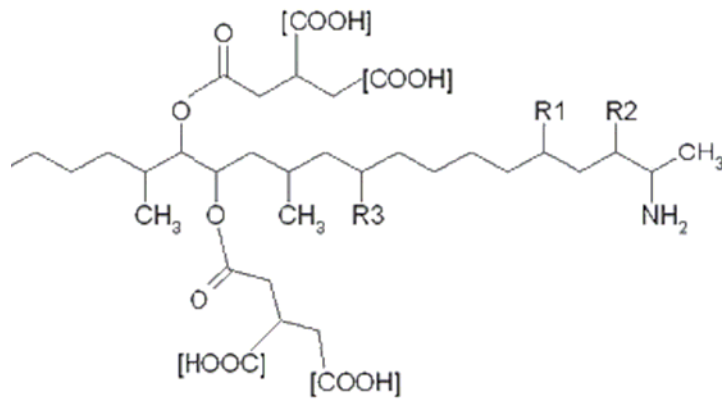
As fumonisinas, micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* (CREPPY, 2002), foram descobertas em 1988 por meio de seu isolamento de culturas de *Fusarium verticillioides* MRC 826 (GELDERBLOM et al., 1988).

Constituem um grupo de micotoxinas que contaminam o milho e seus derivados em nível mundial, inclusive em combinação com outras micotoxinas (TURNER, 1999).

É uma micotoxina produzida no estágio de pré-armazenagem e não são destruídas pelo processamento industrial, comumente utilizado em alimentos (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

A fumonisina B₁ é o principal metabólito produzido pelos fungos *Fusarium moniliforme* e *F. proliferatum*, os quais são achados como contaminantes difundidos no milho (GELDERBLOM et al., 1992). Ela é sempre o metabólito mais abundante e o mais tóxico deste grupo de micotoxinas, representando 70% da concentração total em rações e alimentos naturalmente contaminados, seguido pelas fumonisinas B₂ e B₃ (MURPHY et al., 1993; NORRED, 1993; THIEL, 1991).

Fumonisina B₁, o análogo mais abundante encontrado (GALVANO et al., 2002) tem fórmula empírica C₃₄H₅₉O₁₅ e consiste de um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico e 2-amino-12,16-dimetil, 3,5,10,14,15-pentahidroieicosano (DESJARDINS, 2006). Elas são moléculas fortemente polares, solúveis em água e acetonitrila e insolúveis em solventes orgânicos (POZZI et al., 2002). A estrutura química da fumonisina está demonstrada na Figura 1.



Fumonisina B1: R1= OH; R2= OH; R3= OH;
 Fumonisina B2: R1= OH; R2= OH; R3= H;
 Fumonisina B3: R1= H; R2= OH; R3= OH;

Figura 1 - Fórmula estrutural das fumonisinas B1, B2 e B3.

Inúmeras publicações científicas traduzem as preocupações em avaliar os níveis de fumonisinas no milho e em alimentos contendo milho em diferentes países. A Tabela 3 apresenta a ocorrência das fumonisinas em vários países.

Tabela 3 - Ocorrência das fumonisinas em diversos países.

País	Ano	Tipo de Alimento	Teor de Fumonisinas	Referência
Espanha	1994 a 1996	Milho	FB ₁ : 3,3 µg/g FB ₂ : 1,7 µg/g	Castellá <i>et al.</i> , 1999
México	–	Produtos processados a partir do milho	FB ₁ : 0,79 ppm	Dombrink- Kurtzman e Dvorak, 1999
México (Sonora)	1998/ 1999 1999/ 2000	Milho Milho	FB ₁ : 1,1 a 4,8 mg/kg FB ₁ : 0,4 a 4,4 mg/kg	Cortez-Rocha <i>et al.</i> , 2003
EUA	–	Produtos processados a partir do milho	FB ₁ : 0,16 ppm	Dombrink- Kurtzman e Dvorak, 1999
	–	Colheitas; cereais para consumo humano	FB ₁ : 0,028 a 2,679 mg/kg FB ₂ : 0,03 a 0,797 mg/kg	Gutema <i>et al.</i> , 2000
Uruguai	1995 a 1996	Milho não processado Milho processado Snacks	FB ₁ : 3688 ng/g FB ₁ : 155 ng/g FB ₁ : 314 ng/g	Piñeiro <i>et al.</i> , 1997
Argentina	– –	Milho Milho	FB ₁ +FB ₂ +FB ₃ : 1585 a 9990 ng/g FB ₁ : 0,5 a 5 mg/kg	Sydenham <i>et al.</i> , 1993 Scudamore e Patel, 2000
Brasil	1999 a 2000	Milho para consumo humano	FB ₁ : 3,2 mg/kg FB ₂ : 3,4 mg/kg FB ₁ : 1,7 mg/kg	Whesthuizen <i>et al.</i> , 2003
Brasil (São Paulo)	2000	Alimentos à base de milho Farinha de milho	FB ₁ : 1,1 a 15,3 mg/kg FB ₂ : 0,2 a 3,9 mg/kg FB ₁ : 0,5 a 7,2 mg/kg FB ₂ : 0,1 a 1,8 mg/kg	Bittencourt <i>et al.</i> , 2005
	–	Alimentos infantis à base de milho	FB ₁ +FB ₂ +FB ₃ : 2242 µg/kg	Castro <i>et al.</i> , 2004
	1997		FB ₁ : 250 ng/g FB ₂ : 125 ng/g	
Canadá	1998 1999	Alimentos infantis	FB ₁ : 250 ng/g FB ₂ : 86 ng/g FB ₁ : 250 ng/g FB ₂ : 125 ng/g	Lombaert <i>et al.</i> , 2003
	–	Cereais de pequeno-almoço	FB ₁ : 68 ng/kg FB ₂ : 8 ng/kg	Kim <i>et al.</i> , 2003
Reino Unido	–	Milho	FB ₁ +FB ₂ +FB ₃ : >1000 µg/kg	Scudamore e Patel, 2000
Itália	2001 a 2002	Cereais e alimentos processados	FB ₁ : 0,010 a 2,870 µg/g FB ₂ : 0,010 a 0,790 µg/g	Cirillo <i>et al.</i> , 2003
Suíça	1991	Produtos processados a partir do milho	FB ₁ : 55 a 790 ng/g FB ₂ : 50 a 160 ng/g	Pittet <i>et al.</i> , 1992
França	– 1992	Cereais de pequeno-almoço Milho	FB ₁ : 1 a 1110 µg/kg FB ₁ : 2. 300 a 90 µg/kg FB ₂ : 4.450 a 250 µg/kg	Molinié <i>et al.</i> , 2005 Doko <i>et al.</i> , 1995
Portugal	–	Chá preto e plantas medicinais	FB ₁ : 20 a 700 µg/kg	Martins <i>et al.</i> , 2001
Irão	1998	Milho	FB ₁ : 1,270 a 3,980 µg/g FB ₂ : 0,190 a 1,175 µg/g FB ₃ : 0,155 a 0,960 µg/g	Shephard <i>et al.</i> , 2000
África do Sul (Transkei)	1989	Milho saudável (EC elevado) Milho contaminado (EC elevado)	FB ₁ : 0 a 5380 ng/g FB ₂ : 0 a 1320 ng/g FB ₁ : 3020 a 117520 ng/g FB ₂ : 750 a 22960 ng/g	Thiel <i>et al.</i> , 1992
China (Cantão de Cixian)	1991	Milho saudável	FB ₁ : 30.300 a 47.900 µg/kg	Weidenböner, 2001
Quênia	–	Milho	FB ₁ : apenas 5% das amostras acima de 1.000 ng/g (limite para consumo humano)	Kedera <i>et al.</i> , 1999
Nigéria (Sudoeste)	2001	Milho	FB ₁ : 70 a 1780 µg/kg FB ₂ : 53 a 230 µg/kg	Bankole e Mabekoje, 2004
Turquia	–	Chá de ervas Plantas medicinais	FB ₁ : 0,160 a 1,487 µg/g	Omurtag e Yazicioglu, 2004

Fonte: LINO *et al.*, 2006.

3.4 TOXICIDADE DAS FUMONISINAS

A contaminação de alimentos e compostos com fumonisinas tem sido associada a várias doenças em animais e humanos. As manifestações clínicas que decorrem das toxicoses provocadas pelas fumonisinas, bem como os órgãos atingidos variam de espécie para espécie. Nos cavalos conduz ao aparecimento de leucoencefalomalácia (LEME), uma síndrome que atinge o sistema nervoso central dos cavalos e que leva a liquefação da substância branca do cérebro como mostra na Figura 2, em suínos provocam edema pulmonar (PPE). Em ovelhas, ratos e coelhos induzem a toxicidade renal, sendo também hepatotóxica para os segundos. Outras espécies também são atingidas por toxicoses provocadas por estas micotoxinas. Também tem sido epidemiologicamente relacionadas com o câncer de esôfago (EC) em humanos (MEYER, 2003).



Figura 2 - Cérebro. Observa-se extensa área de malácia no encéfalo direito, caracterizada por áreas amareladas (edema) ou hemorrágicas e cavitações da substância branca.
Fonte: Câmara et al., 2008.

Embora o efeito de fumonisina em humanos não esteja definido, existem relatos de sintomas gastrointestinais na Índia (BHAT et al., 1997), assim como apoptose em cultura de células humanas (TOLLESON et al., 1999). Não obstante, a associação de exposição humana a fumonisina concentra-se no provável efeito promotor de câncer esofágico na África do Sul (SYDENHAM et al., 1990; RHEEDER et al., 1992), China (CHU; LI, 1994) e norte da Itália (FRANCESCHI et al., 1990). O milho é o principal alimento nas regiões endêmicas de câncer esofágico em Transkey (África do Sul), onde frequentemente ocorre alta contaminação por *F. verticillioides* e fumonisina (SYDENHAM et al., 1990; RHEEDER et al., 1992).

A constante ingestão de fumonisinas através de produtos e derivados de milho tem sido associada ao câncer de esôfago em Transkey (África) e Lixian (China), onde se verifica alta incidência dessa patologia. Os níveis médios de FB₁ e FB₂ foram significativamente maiores, tanto em grão de milho mofado, quanto nos aparentemente saudáveis, na região de alta incidência de câncer de esôfago, quando comparados com áreas de baixa incidência, na África do Sul, no período compreendido entre 1985 e 1989 (SYDENHAM et al., 1990). Em uma amostra de milho aparentemente saudável, encontrou-se 44 µg/g de FB₁ e grão visivelmente contaminado por *Fusarium* apresentou contaminação de 83 µg/g de FB₁ (MARASAS, 1996).

Desde 1980 tem sido observado que a leucoencefalomalacia (LEME) em cavalos, os edemas pulmonares em suínos e o câncer esofágico em humanos ocorrem em áreas do mundo onde altos níveis de fumonisina são encontrados em alimentos à base de grãos (YOSHIZAWA, 1994).

Wilson et al. (1990) correlacionaram a ocorrência de fumonisinas com o diagnóstico de LEME, na África do Sul, analisando amostras de milho mofado com concentração de FB₁ que variavam de 37 a 122 µg/g. Neste mesmo ano, Plattner et al. (1990) e Shephard et al. (1990) também detectaram FB₁ e FB₂ em amostras de milho destinado a equinos que apresentaram quadro típico de LEME nos Estados Unidos e África do Sul, respectivamente.

Em 2002, a Agência Internacional de Pesquisa Sobre Cancro (IARC) classificou a FB₁ como possivelmente carcinogênica para o homem, incluindo-a no grupo 2B (IARC, 2002).

No Brasil, são freqüentes os relatos de leucoencéfalomalácia equina (RIET-CORRÊA et al., 1982; HIROOKA et al., 1991; HIROOKA; YAMAGUCHI, 1994; MEIRELLES et al., 1992; MEIRELLES et al., 1994). As primeiras citações sobre a detecção de FB₁ e surtos de LEME ocorridos no país foram realizados por MEIRELLES et al., 1991; HIROOKA et al., 1991; YAMAGUCHI et al., 1992; HIROOKA et al., 1996.

No Brasil ainda não foram estabelecidos limites mínimos aceitáveis em alimentos. Com uma dose de 10mg/g em ração para equinos, já aparecem os sintomas da doença. A contaminação de alimentos por fumonisina destinados a animais (milho elaborado) é um problema muito sério, pois acarreta grandes perdas econômicas a criadores de suínos e equinos (SCUSSEL, 1998).

O Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives determina uma ingestão diária máxima tolerável provisória (PTMDI) para humanos de 2 µg/kg peso corporal/dia para a fumonisina B₁ e B₂ isoladas ou combinadas em alimentos (JECFA, 2001). De acordo com esta recomendação, uma criança de 20 kg não deverá exceder uma dose diária de 40 µg (MOLINIÉ et al., 2005).

3.5 OCORRÊNCIA MUNDIAL

Diversos levantamentos realizados no exterior e no Brasil com milho e produtos derivados constataram um número considerável de amostras contaminadas com micotoxinas (KAWASHIMA; VALENTE SOARES, 2006).

A primeira ocorrência natural de fumonisina foi descrita por Sydenham et al. (1990), a partir de amostras de milho mofado colhidas em uma área de Transkei, sul da África, que apresentava alta incidência de câncer de esôfago em seres humanos. Os níveis detectados nas amostras variavam de 44 µg/g a 83 µg/g. Altos níveis de contaminação (117 µg/g) também foram encontrados por Thiel et al. (1992) em milho proveniente de algumas regiões da África com histórico da doença.

As fumonisinias foram detectadas naturalmente em vários tipos de alimentos, em vários países (Canadá, Egito, Peru, África do Sul, EUA), indicando, a exposição do homem as micotoxinas em até 3 mg/kg (SYDENHAM et al., 1991). Nos Estados Unidos, Rottinghaus et al. (1992) encontraram concentrações de FB₁ entre 0,1 a 5,0 mg/kg em 15% das amostras de milho analisadas. Em outro trabalho, em amostras

de farelo de milho provenientes da mesma região produtora, os níveis detectados foram de até 2,8 mg/kg (HOLCOMB et al., 1993).

Sydenham et al. (1993), analisando 17 amostras de milho de dois municípios argentinos, detectaram fumonisina total em níveis de 1,59 a 9,99 µg/g, sendo 1,11 a 6,70 µg/g (FB₁); 0,33 a 2,68 µg/g (FB₂) e 0,11 a 0,86 µg/g (FB₃).

Nos países africanos constituídos de Botswana, Moçambique, África do Sul, Malawi, Zâmbia, Zimbábue, Kenia, Tanzânia, a fumonisina ocorreu na frequência de 92,5% e nas concentrações de 0,02 µg/g a 2,74 µg/g, para FB₁ variando de 0,02 a 1,91 µg/g. (DOKO et al., 1996).

Na Comunidade Européia também obtiveram situação semelhante, monitorando milho proveniente da Itália, Croácia, Polônia, Portugal, Romênia (DOKO et al., 1995). Doko et al. (1995) dividiram os países em dois grupos, baseados na incidência/ contaminação. No primeiro agruparam-se aqueles com alto índice de contaminação, estando incluídos a Itália e Portugal com incidência de 100% de *F. verticillioides* e FB₁ na faixa de 1,71 a 4,45 µg/g no milho. No segundo grupo incluíram os países com ocorrência de 50% de *F. verticillioides* e FB₁ com nível menor ou igual a 0,07 µg/g no milho.

3.6 OCORRÊNCIA NO BRASIL

O Brasil, sendo um país de clima tropical, apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento dos fungos e conseqüentemente para a produção de micotoxinas.

No Brasil, a avaliação da presença de micotoxinas em alimentos foi realizada principalmente no centro-sul e no sul do país. Como conseqüência das dimensões continentais do país, existe a possibilidade de que a presença e o teor de micotoxinas em alimentos produzidos e consumidos sejam desiguais entre as diversas regiões (KAWASHIMA; VALENTE SOARES, 2006). Devido à predominância de regiões de clima tropical e subtropical, têm-se verificado grande incidência desta micotoxina, e altos níveis de contaminação. Porém, ainda não existe legislação específica que determine o nível de contaminação considerado seguro para alimentos destinados a consumo humano e animal.

No Brasil, Yamaguchi et al. (1992) analisaram 39 lotes de milho colhidos na safra de 1990 e 1991, provenientes de quatro regiões produtoras no Estado do Paraná. A análise de fumonisina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi positiva em 97,4% das amostras para FB₁ e 4,8% para FB₂. As concentrações das micotoxinas detectadas no milho variaram, conforme a região, de 0,6 a 12,6 mg/kg para FB₁ e 0,0 a 10,4 mg/kg para FB₂.

Hirooka et al. (1996) analisaram 48 amostras de milho nos Estado do Paraná e 9 no Mato Grosso do sul e Goiás, colhidas entre 1990 e 1991. Os pesquisadores encontraram fumonisinas em todas as amostras colhidas no Paraná, com níveis que variavam, de acordo com a região, de 3,25 a 4,79 mg/kg de FB₁ e 2,34 a 3,45 mg/kg para FB₂. Com exceção de uma amostra proveniente do Estado de Goiás, as outras provenientes da região Central do Brasil também estavam contaminadas com FB₁ e FB₂, 5,45 e 5,0 mg/kg, respectivamente.

Já no Rio Grande do Sul, Mallmann et al. (1997) analisaram 169 amostras de alimentos entre os anos de 1996 e 1997 e verificaram a contaminação por fumonisina em 47,1% das amostras de milho, com concentração média de 8,4 mg/Kg.

Estudos realizados por Orsi et al. (2000) mostraram a ocorrência natural de fumonisinas em 195 amostras de híbridos no Estado de São Paulo, sendo 90,2% delas positivas para FB₁ e 97,4 para FB₂. Os índices médios de contaminação foram de 9,72 mg/kg de FB₁ e 7,67 mg/kg de FB₂. Diferenças regionais na concentração de fumonisina foram encontradas quando o mesmo milho híbrido foi analisado no Estado do Paraná, indicando interferências climáticas na predominância de linhagens toxigênicas de *Fusarium* (ONO et al., 2001).

Foram coletadas, no período de setembro de 2006 a fevereiro de 2007, por Miyamoto et al., na região de Pirassununga - SP, 24 amostras de cada produto à base de milho: milho em grão, fubá e farinha de milho, totalizando 72 amostras analisadas. Do total de amostras analisadas, 67 (93,0%) apresentaram níveis de fumonisina acima dos limites de detecção (30 µg/kg). As concentrações médias de FB₁ foram de 1420 µg/kg nas amostras de milho m grão, 763 µg/kg no fubá e 1234 µg/kg na farinha de milho.

Santos et al. (2008) analisaram 90 amostras de farinha de milho pré-cozida e flocada, em diversos municípios do Estado da Bahia. Das 90 amostras analisadas

27% apresentaram fungos. Foi possível verificar que as amostras oriundas dos municípios com temperatura média anual na faixa de 25,5° C e umidade relativa do ar elevada (76% a 80%) apresentaram maior percentual de contaminação, em torno de 42% em relação aos demais.

3.7 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA MICOTOXINAS

Desde a descoberta das micotoxinas e sua caracterização em 1988, houve um progresso significativo nos métodos analíticos usados para detectá-las (DUNCAN et al., 1998).

Vários métodos podem ser utilizados para a detecção e quantificação de micotoxinas em alimentos e, quando possível, em tecido muscular, leite, urina, soro, fezes e sangue. Os métodos existentes para a determinação de micotoxinas baseiam-se em alguma medida física ou característica química das mesmas, como absorção na região do ultravioleta, fluorescência ou mudança de cor quando ocorre alguma reação química (SABINO, 1995).

O desenvolvimento de métodos analíticos com alta sensibilidade, especificidade, rapidez, reprodutibilidade e facilidade de uso, além da exatidão e precisão são essenciais para avaliar exposição humana/animal e qualidade de matérias – primas agropecuárias (ONO et al., 2000).

Um método ideal, eficiente e adequado para análise de micotoxinas deve ser simples, rápido, preciso, barato, automatizado, sensível e seletivo. Contudo, nenhum método satisfaz a todos esses requisitos. Consequentemente, o método adequado deve ser escolhido pelo objetivo da análise que se quer realizar e o tipo do trabalho, de rotina ou pesquisa (BARNI, 2001).

A sequência analítica básica para a maioria dos métodos químicos usados em análise de micotoxina é: a amostragem, preparo das amostras, extração, limpeza, detecção e quantificação, e a confirmação.

A grande maioria dos métodos referenciados envolve extração, recorrendo a misturas de solventes polares, seguido de um processo de purificação com extração em fase sólida (SPE) em colunas de fase reversa, colunas de troca iônica forte (SAX) ou colunas de imunoafinidade (IAC).

Os métodos desenvolvidos para proceder às análises quantitativas e qualitativas de toxinas incluem cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-MS), cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS), cromatografia de gasosa-espectroscopia infravermelho (CG-IV). Além de metodologia química, os imunoenaios, representados por “enzyme linked immunosorbent assay” – ELISA e imunoafinidade vêm sendo muito empregados (PALLARONI et al., 2003; PETSKA et al., 1994; PETTERSSON et al., 2003; SCOTT et al., 1997; SOLEAS et al., 2001).

3.8 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA FUMONISINAS

Os métodos para determinação de micotoxinas usualmente incluem passos básicos de amostragem, extração, limpeza, separação, concentração do resíduo, detecção/quantificação e confirmação.

3.8.1 Amostragem

A amostragem é definida como o processo de retirada de uma quantidade adequada de um lote grande, para teste, de modo que a proporção e a distribuição dos fatores em teste sejam as mesmas tanto no total (lote) quanto na parte retirada (amostra).

A coleta da amostra e seu preparo é o passo mais importante no procedimento de análise de micotoxinas. Ela deve ser representativa do lote à ser analisado (SCUSSEL, 1998).

Se a amostra retirada para a análise não for representativa do lote, o resultado não terá significado algum. Não importa se a análise for cuidadosa se as amostras forem preparadas impropriamente (SCUSSEL, 1998).

O tamanho/peso da amostra a ser coletada depende do: objetivo de análise, tamanho do lote, tipo de alimento, custo e facilidade de embalagem até o laboratório (SCUSSEL, 1998).

Segundo Scussel (1998) os materiais utilizados para coleta das amostras são: sacos (plásticos, de papel, ou de tecido [dependendo do produto]), recipientes de vidro, isopor, etc.

Existe uma série de coletores de grão planejados para possibilitar a avaliação da contaminação de grandes lotes através da obtenção de amostras pequenas representativas. Os locais de retirada de amostra, o número de amostras e a quantidade de produtos retirado determinam a precisão do sistema (SCUSSEL, 1998).

À partir da amostra coletada, deverá ser realizada uma redução e homogeneização para ser enviada ao laboratório de análise. Esta redução do tamanho da amostra pode ser feita manualmente ou mecanicamente (SCUSSEL, 1998).

3.8.2 Extração

A extração baseia-se na separação das micotoxinas presentes na amostra através de sua afinidade (solubilidade) com determinados solventes (Scussel, 1998).

A capacidade de extração das fumonisinas a partir de produtos à base de milho pode variar significativamente e ser influenciada por fatores como a composição química da matriz, o tipo de solvente de extração e respectivo volume, o pH do solvente de extração e outras condições experimentais (VOSS et al., 2001).

Com o objetivo de garantir uma extração eficaz das fumonisinas presentes em alimentos, vários solventes têm sido utilizados. Em virtude de se tratar de moléculas fortemente polares, as fumonisinas são solúveis em água e solventes polares e insolúveis em solventes orgânicos. A sua extração é conseguida usando água, acetonitrila e metanol (POZZI, 2002).

A mistura metanol/água é amplamente utilizada. Porém enquanto alguns utilizam razões de 4:1 (SCUDAMORE et al., 1997; CORTEZ-ROCHA et al., 2003), outros adotam razões de 3:1. É o caso de Gelderblom et al. (1988) que usaram esta mistura para extrair pela primeira vez FB₁ e FB₂ de culturas de milho contaminadas com *Fusarium moniliforme* MRC 826. Também Shephard et al. (1990) ao desenvolverem o primeiro método com CLAE para determinação simultânea de FB₁ e FB₂ em milho naturalmente contaminado e em rações, usaram a mesma

proporção. Este método foi adaptado pela AOAC International em 1996. Outros autores adotaram também esta proporção, como por exemplo, Sydenham et al. (1992), Piñeiro et al. (1997), Castellá et al. (1999), Picco et al. (1999) e Bankole e Mabekoje (2004).

3.8.3 Limpeza

Um grande número de compostos interferentes está presente nas amostras e devem, quando possível, ser completamente removidos.

A limpeza permite remover impurezas dos alimentos e concentrar as fumonisinas. Esta pode ser conseguida recorrendo à extração em fase sólida (SPE) em fase reversa, usando sílica octadecilgada C₁₈ ou troca iônica (SAX). Podem também usar-se de colunas de imunoafinidade (IAC).

IAC – Coluna de imunoafinidade

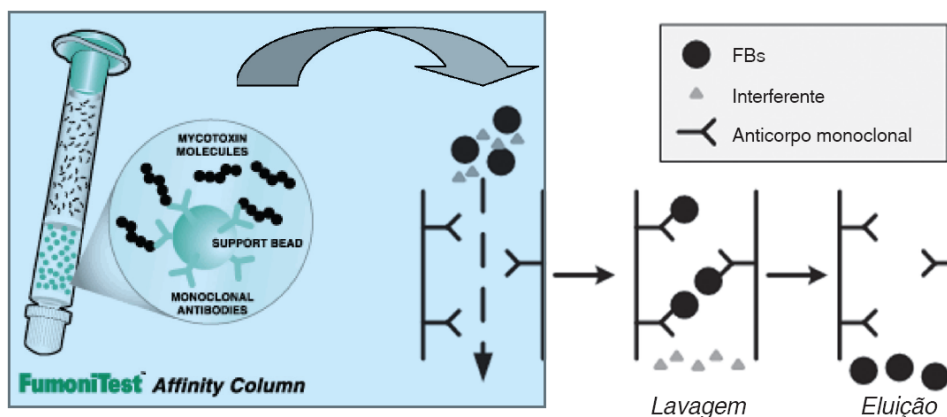


Figura 3 - Esquema representativo da purificação com colunas de imunoafinidade.
Fonte: Silva, 2008.

Recente progresso tem sido alcançado para a limpeza de extratos alimentares contendo micotoxinas com o uso de colunas de imunoafinidade. Estas colunas são compostas de anticorpos monoclonais específicos para uma determinada micotoxina. O extrato é forçado a passar pela coluna e a micotoxina se liga ao anticorpo. Os materiais interferentes podem ser retirados da coluna com água ou tampões aquosos e depois a micotoxina é eluída com solvente adequado. Estas colunas eliminam muitos interferentes, geram baixos limites de detecção, reduzem a

velocidade da análise, utilizam pouco solvente, apresentam possibilidade de automação e de reutilização. A desvantagem é o alto custo, o fato de que existem colunas somente para algumas micotoxinas e às vezes há necessidade de se utilizar uma pré-coluna para limpeza, como a SPE (SCOTT; TRUCKSESS, 1997).

SPE – Extração em fase sólida



Figura 4 - Cartuchos para extração em fase sólida
Fonte: Itasul, [200-?].

Em cartuchos para extração em fase sólida (SPE), a técnica envolve a partição das toxinas e compostos interferentes entre a fase móvel e fase estacionária (BIANCARDI; RIBERZANI, 1996; WILSON; ROMER, 1991).

As colunas SAX permitem melhores resultados que as C₁₈ para as fumonisinas intactas, no entanto, requerem uma monitoração do pH do extrato da amostra, e um controle cuidadoso do fluxo de eluição, que não pode ser superior a 1mL/min para a obtenção de recuperações reprodutíveis (SHEPARD, 1998).

3.8.4 Derivatização

Como as fumonisinas não possuem nenhum grupo cromóforo e, portanto, não absorvem luz UV, nem visível, nem apresentam fluorescência nativa para se conseguir uma detecção com sensibilidade a baixos níveis, necessários para análise de alimentos contaminados, a derivatização dos extratos das amostras é imprescindível. A reação de derivatização dá-se entre o reagente derivatizante e a

amina primária das fumonisinas. Na maioria dos casos é feita uma derivatização em pré-coluna (SHEPARD, 1998; PLATTNER, 1999; VISCONTI, 2000).

Uma reação de derivatização é necessária para possibilitar a sua determinação por CLAE com detector de fluorescência ou de absorbância no UV/VS. Os reagentes propostos até agora para derivatização tem sido fluorescamina (LD), ortoftaldeído (OPA), naftaleno -2,3- dicarboxaldeído (NDA), 4-fluoro-7-nitrobenzofurano (NBD-F) e fluorenilmetil cloroformato (FMOC) (SYDENHAM et al. 1996).

Shephard et al. (1990) utilizaram ortoftaldeído (OPA), na determinação quantitativa de FB₁ e FB₂ em amostras de milho naturalmente contaminado. A tentativa de derivatização com fluorescamina (LD) não produziu resultados satisfatórios, uma vez que se obtiveram dois picos cromatográficos, devido à formação de dois produtos de reação. A fluorescamina foi também usada por Ross et al. (1991).

Em 1994, Chu e Li comparam as porcentagens de recuperação ao utilizar OPA e NDA na derivatização de amostras de milho com bolor em regiões da China com alta incidência de câncer esofágico (EC). Concluíram que com OPA se obtém porcentagens de recuperação superiores para níveis de toxinas mais elevados e que com NDA se obtém valores superiores de recuperação para níveis de toxinas mais baixos.

3.8.5 Detecção e Quantificação

Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CDD foi o primeiro método desenvolvido para a determinação de fumonisinas, foi desenvolvido durante o isolamento destas micotoxinas a partir de culturas de *Fusarium moniliforme* MRC 826 em milho, com o objetivo de monitorizar os eluídos das colunas. O método envolvia CCD em fase reversa em placas com sílica C₁₈ modificada, usando como solvente metanol-água (3:1), e também CCD em fase normal em placas de sílica, usando como solvente uma mistura de clorofórmio-metanol-água-ácido acético. Finalmente as fumonisinas eram visualizadas através da pulverização com soluções de ninhidrina (GELDERBLOM et al., 1988). Esta

técnica foi também utilizada por Cawood et al., (1990), Sydenham et al., (1990), Ross et al., (1991), Plattner et al., (1992), Tseng e Liu, (1997).

Apesar de útil para monitorar os efluentes das colunas e analisar culturas de fungos, o limite de detecção utilizando a ninhidrina como reagente revelador, não permitiu sua aplicação com sucesso na determinação de fumonisinas em milho naturalmente contaminado (SYDENHAM et al., 1990). Já a utilização de fluorescamina como reagente revelador melhorou a sensibilidade para a visualização das fumonisinas com luz UV, obtendo maior limite de detecção, e a seletividade do método possibilitou o seu uso na análise de milho contaminado (SHEPHARD, 1998).

Cromatografia Gasosa (CG)

O desenvolvimento inicial de metodologias analíticas aplicadas à análise de fumonisinas recorreu a técnicas de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama GC-FID (SYDENHAM et al., 1990). Os procedimentos que utilizam CG tem vantagem de serem combinados com MS para confirmação de resultados.

A metodologia CG-MS é mais demorada, e por esta razão não é apropriada para se efetuar a análise de um grande número de amostras (SYDENHAM et al., 1992).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica analítica de separação mais usada. A razão desta popularidade, além de elevada sensibilidade, tem capacidade para efetuar determinações precisas e de separar espécies não voláteis, deve-se sobretudo ao fato de possuir uma grande aplicabilidade a substâncias com interesse primordial para a indústria e na investigação científica (SKOOG et al., 1998).

Como as fumonisinas são moléculas polares, solúveis em água e em solventes polares, são ideais para detecção e quantificação por CLAE em fase reversa.

A maioria dos procedimentos para CLAE utiliza a fase reversa C_{18} para separar as fumonisinas. A fase estacionária é apolar e a fase móvel usada é polar (SKOOG et al., 1998). Assim, em ambas as eluições os solventes mais utilizados

são metanol, acetonitrila, água, ácido acético e dihidrogenofosfato de sódio. Verificam-se variações nas misturas utilizadas no que se refere às proporções dos diferentes solventes. O pH das soluções, em alguns casos, é ajustado com ácido ortofosfórico a 3,3 ou 3,35.

As fumonisinas não eluem convenientemente na maior parte das colunas de fase reversa quando são injetadas com sistemas de solventes neutros e não tamponados. Para se conseguir melhores resultados a fase móvel deve ser acídica, o que se consegue através da adição de ácido acético ou fórmico à fase móvel ou pelo uso de um tampão volátil como o acetato de amônio ou o formato de amônio (PLATTNER, 1999).

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência é amplamente usada na análise de fumonisinas em alimentos para consumo humano e animal (XIE et al., 1997). Este método não dispensa a utilização de reagentes de derivatização, uma vez que se trata de uma molécula sem fluorescência nativa. No entanto, a derivatização pode introduzir variabilidade nos resultados, implicar perdas de amostras e também aumentar o tempo do procedimento analítico (ROYER et al., 2004).

Imunoensaios

Vários métodos por imunoensaios têm sido desenvolvidos, porém somente três tem sido estudado extensivamente e aplicados às micotoxinas. São eles: RIA, ELISA e cromatografia de imunoafinidade.

A indústria alimentar usa ensaios imunológicos em virtude da sua simplicidade, boa reprodutibilidade, e elevada sensibilidade, devido à especificidade das reações antígeno-anticorpo, associada a custos menos onerosos e ao uso de equipamentos não sofisticados, como o método ELISA, para fazer o “screening” de micotoxinas. Este procedimento apresenta, contudo, a desvantagem de não distinguir e quantificar resíduos múltiplos, sendo necessárias muitas análises individuais para determinar diferentes micotoxinas (ABOUZIED; PETSKA, 1994).

Ensaio imunológico mostram-se ferramentas úteis, complementares dos métodos físico-químicos, para analisar micotoxinas em alimentos. Anticorpos mono e policlonais têm sido produzidos para reagir contra as fumonisinas (SCHNEIDER et al., 1995).

3.8.6 Confirmação

A confirmação das amostras positivas é essencial para assegurar a qualidade da análise (VALENTA, 1998).

A detecção de micotoxinas baseada nas propriedades fluorescentes e cromatográficas é inespecífica, desde que muitas substâncias fluorescentes podem ter o mesmo R_f e tempo de retenção semelhante de outras toxinas. Portanto, há necessidade de testes confirmatórios para identificar as micotoxinas (SCUSSEL, 1998).

Os métodos mais aceitáveis são aqueles que obtêm derivativos químicos com propriedades cromatográficas modificadas. A mobilidade dos derivados fluorescentes é comparada com aquela dos derivados padrões (SCUSSEL, 1998).

Em 1991, Thiel et al. confirmaram a produção de FB₁ e FB₂ por culturas de diferentes espécies de *Fusarium* em milho, utilizando CLAE com derivatização por OPA e cromatografia gasosa acoplado a espectro de massa (CG-MS) com derivatização por trifluoroacetilimidazole.

Ross et al. (1991) e Shephard et al. (1996) confirmaram a presença de fumonisinas em rações associadas a problemas animais e em milho, usando CCD e CG-MS. A CG-MS foi também a técnica escolhida por Plattner et al. (1992) para confirmar a presença de fumonisinas em culturas de *Fusarium moniliforme*.

4 CONCLUSÃO

Foi verificado que a incidência de fumonisina no Brasil é grande e os níveis de contaminação são bem acentuados. Na maioria das amostras de milho, fubá e farinha de milho analisadas foram encontradas essa micotoxina em grande porcentagem.

A metodologia mais utilizada para análise de fumonisina é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência. A amostra é extraída com uma mistura de solventes polares, seguida por um processo de limpeza, utilizando colunas de imunoafinidade (IAC), ou colunas de fase reversa com extração em fase sólida (SPE), ou colunas de troca iônica forte (SAX). Após a limpeza é realizado o processo de derivatização para que a leitura seja possível em detector de fluorescência.

REFERÊNCIAS

ABOUZIED, M. M.; PETSKA, J. J. Simultaneous screening of fumonisin B₁, and zearalenona by line immunoblot: a computer-assisted multianalyte assay system. **Journal AOAC International**, v. 77, p. 495, 1994.

ALLCROFT, P.; CARNAGHAN, R. B. A. Groundnut toxicity *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. Preliminary Communication. **Vet Rec**, [S.l.], v. 74, p. 863-864, 1962.

BHAT, R. V. et al. A foodborne disease outbreak due to the consumption of fumonisin contaminated sorghum and maize. **Journal of Toxicology – Clinical Toxicology**, New York, v. 35, p.249-255, 1997.

CÂMARA, A. C. L. et al. Leucoencefalomalácia em equinos no estado de Pernambuco. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 470-479, abr./jun. 2008.

BANKOLE, S. A.; MABEKOJE, O. O. Occurrence of aflatoxins and fumonisins in preharvest maize from south-western Nigeria. **Food Additives Contaminants**, v. 21, p.251-255, 2004.

BIANCARDI, A.; RIBERZANI, A. Determination of ochratoxin A in cereals and feed by SAX-SPE clean up and LC fluorometric detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technology**, v. 19, n. 15, p. 2395-2407, 1996.

CASTELLÁ, G.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J. Surveillance of fumonisin in maize-based feeds and cereals from Spain. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 4707-4710, 1999.

CAWOOD, M. E. et al. Isolation of the fumonisin mycotoxins: A quantitative approach. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 39, p. 1958, 1990.

CORTEZ-ROCHA, M. O. et al. Fumonisins and fungal species in corn from Sonora, Mexico. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 70, p. 668-673, 2003.

CHEN, J., MIROCHA, C.J., XIE, W., HOGGE, L., OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternate* f.sp. *Tycopersici*. **Applied e Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, p. 3928-3931, 1992.

CHU, F. S.; LI, G. Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, 60, p. 847-852, 1994.

DESJARDINS, A. E. *Fusarium* Micotoxins. **Chemistry, Genetics and Biology**. St. Paul: The American Phytopathological Society, p. 260, 2006.

DINIZ, S. S. de S. **Micotoxinas**. Maringá: Livraria e Editora Rural, 2002. 181 p.

DOKO, M. B. et al. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.43 p. 429-434, 1995.

DOKO, M. B. et al. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 3240-3243, 1996.

DUCAN, K. et al. **Journal of Chromatografia A.**, v. 41, p.615, 1998.

EMBRAPA. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal, p. 10-47, 2007.

FIGUEIRA, E. L. Z. et al. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 359-378, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Worldwide regulations for micotoxins in food and in feed in 2003**. (Food and Nutrition Paper, 81). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e07.htm>>. Acesso em: 16 set. 2009.

FRANCESCHI, S. et al. Maize and risk of câncer of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 82 p. 1407-1411, 1990.

GELDERBLOM, W. C. A. et al. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 1806, 1988.

GELDERBLOM, W. C. A. et al. Fumonisins isolation, chemical characterization and biological effects. **Mycopathology**, v. 117, p. 11-16, 1992.

HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M.; AOYAMA, S. The natural occurrence of fumonisin in Brazilian corn kernels. **Food Additives Contaminants**, [S.l.], v. 13, p. 173-183, 1996.

HOLCOMB, M.; SUTHERLAND, J. B.; CHIARELLI, M. D. HPLC and FAB mass spectrometry analysis of fumonisin B₁ and B₂ produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. **Journal Agriculture Food Chemistry**, [S.l.], v. 41, p. 357-360, 1993.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz. São Paulo, p. 761-762, 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Classificação das micotoxinas. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Listagentsalphorder.pdf>>. Acesso em 20 set. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1190&id_pagina=1>. Acesso em: 16 nov. 2009.

ITASUL. Consumíveis de cromatografia. Porto Alegre, [200-?]. Disponível em: <<http://www.itasul.com.br/imagens/equipamentos/CONSUMÍVEIS.jpg>>. Acesso em: 16 nov. 2009.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. Qualidade Sanitária de Grão e de Forragens Conservadas “versus” Desempenho Animal e Qualidade de seus Produtos. Disponível em: <http://www.nupel.uem.br?desempenho.pdf>. Acesso em: 21 set. 2009.

KAWASHIMA, L. M.; VALENTE SOARES, L. M. Incidência de fumonisina B₁, aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Revista ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, 2006.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Fumonisinas; presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, p. 181-192, 2006.

MALLMANN, C., SANTURIO, J. M.; DILKIN, P. Incidência de fumonisina B1 em milho e rações no Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 7., 1997, Maracay, Venezuela. **Anais...** Maracay: Sociedad Latino Americana de Micotoxicologia, 1997. p. 73.

MARASAS, W. F. O. Fumonisins: history, worldwide occurrence and impact. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 392, p. 1-17, 1996.

MEYER, K. et al. **Food Additives Contaminants**. v. 20, p. 639, 2003.

MIYAMOTO, J. A. et al. Quantificação de fumonisinas em produtos à base de milho na região de Pirassununga, Brasil. **Revista Ciências da Vida**, Seropédica, v. 28, supl., p. 189-191, ago. 2008. Disponível em: <<http://www.editora.ufrj.br/rcv2/vida28supl/SCV v.28/TRAPDF/063.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2009.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisins in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Disease*, Saint Paul, v. 81, p. 556-565, 1997.

ONO, E. Y. S. et al. A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brasil. **Food Agriculture Immunology**, v. 1, n. 1, p. 5-14, 2000.

ONO, E. Y. S.; ONO, M. A.; FUNO, F. Y. Evaluation of fumonisin-aflatoxin – occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Additives Contaminants**, [S.l.], v. 18, n. 8, p. 719-729, 2001.

ORSI, R. B. et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal Stored Prod. Res.**, v. 36, p. 75-87, 2000.

- PALLARONI, L.; VON HOLST, C. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal Chromatogr. A.**, v. 989, p. 257-264, 2003.
- PESTKA, J. J. et al. Comparative assessment of fumonisin in grain based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. **Journal Food Prot.**, v. 57, n. 2, p.169-172, 1994.
- PETTERSSON, H.; ABERG, L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. **Food Control**, v. 14, n. 4, p. 229-232, 2003.
- PICCO, M. et al. Aflatoxin B₁, and FB₁ in mixed culture of *Aspergillus flavus* and *Fusarium proliferatum* on maize. **Natural Toxins**, v. 7, p. 331-336, 1999.
- PIÑEIRO, M. S. et al. Fumonisin levels in Uruguayan corn products. **Journal of AOAC International**, v. 80, p. 825-828, 1997.
- PITTET, A.; PARISOD, V.; SCHELLENBERG, M. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in corn-based products from the Swiss market. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 40, p. 1352-1354, 1992.
- POMERANS, Y. Biochemical, functional and nutritive changes during storage. In: CHRISTENSEN, C. M. (Ed.). **Storage of cereal grains and their products**, 1982. p.145-217.
- POZZI, C. R. et al. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisin. **Ciência Rural**, v. 32, p. 901-907, 2002.
- PLATTNER, R. D. HPLC/MS analyses of *Fusarium* mycotoxins, fumonisin and deoxynivalenol. **Natural Toxins**, v. 7, p. 365-370, 1999.
- RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.
- RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their micotoxicoses – An overview. International **Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. ?, p. ?, 2007.
- ROSS, P. F. et al. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, v. 114, p. 129-135, 1991.
- ROYER, D.; HUMPF, H. U.; GUY, P. A. Quantitative analysis of *Fusarium* mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, p. 678-692, 2004.
- SANTOS, G. C. et al. Ocorrência de fungos toxigênicos em farinhas de milho comercializadas no Estado da Bahia – 2007/2008. Dados preliminares. **Revista Ciência Vida**, Seropédica, v. 28, supl., p. 174-176, 2008.

SCHNEIDER, E.; USLEBER, E.; MARTLBAUER, E. Rapid detection of FB₁ in corn-based food by competitive direct dipstick enzyme immunoassay with integrated negative control reaction. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, 2548-2552, 1995.

SCUDAMORE, K. A.; NAWAZ, S.; HETMANSKI, M. T. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, p. 175-186, 1997.

SCOTT, P. M.; TRUCKSESS, M. W. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis, **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 80, n. 5, p. 941-949, 1997.

SCUSSEL, V. M. Micotoxinas em alimentos. Ed. Insular, 1998.

SHEPHARD, G. S. et al. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 2077-2087, 1990.

SHEPHARD, G. S. et al. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of AOAC International**, v. 79, p. 671-687, 1996.

SHEPHARD, G. S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. **Journal of Chromatografia A.**, v. 815, p. 31-39, 1998.

SILVA, L. J. G. **Avaliação e validação do grau de exposição de distintos tipos de populações às fumonisin B1 e B2:** alimentos contaminados, teor na urina e relação esfinganina-esfingosina. 2008. 232f. Tese (Doutorado em Ciências e tecnologias da Saúde)-Faculdade de farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAM, T. A. In Principles of Instrumental Analysis 5th. Philadelphia: Brace college publishers; Hartcourt, 1998.

SOLEAS, G. J.; Yan, J.; GOLDBERG, D. M. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, n. 6. p. 2733-2740, 2001.

STEYN, P. S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. **Toxicology Letters**. Amsterdam, v. 82/83, p. 843-851, 1995.

SYDENHAM, E. W.; GELDERBLUM, W. C. A.; THIEL, P. G. Evidence for the natural occurrence of Fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, [S.I.], v. 38, p. 285-290, 1990.

SYDENHAM, E. W. et al. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Trankey, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v.38, p.1900-1903, 1990.

SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; THIEL, P. G. Liquid chromatographic determination of fumonisin B₁, B₂ and B₃ in foods and feeds. **Journal of AOAC International**, v. 75, p. 313-318, 1992.

SYDENHAM, E.W.; SHEPARD, G. S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. GILBERT, J. (Ed.). **Progress in Food Contaminant Analysis**. London: Backie Academic & Professional, p. 65-146, 1996.

THE JOINT FAO/WHO COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Micotoxinas. Disponível em: < <http://www.codexalimentarius.net/web/jecfa.jsp>>. Acesso em: 20 set. 2009.

THIEL, P. G. et al. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1089-1093, 1991.

THIEL, P. G. et al. The implications of naturally occurring levels of fumonisin in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, v.117, p. 3-9, 1992.

TSENG, T. -C. LIU, C.-Y. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in corn-based foodstuffs in Taiwan market. **Mycopathologia**, v. 137, p. 57-61, 1997.

TOLLESON, W. H. et al. Fumonisin B₁ induces apoptosis in culture human keratinocytes through sphinganine accumulation and ceramide depletion. **International and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 4799-4801, 1999.

VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissue and fluids. **Journal of Chromatography A.**, v. 815, p. 75-92, 1998.

VISCONTI, A. et al. Stability of fumonisins (FB₁ and FB₂) in solution. **Food Additives and Contaminants**, v. 11, n. 4, p. 427-431, 1994.

VOSS, K. A. et al. Fate of fumonisins during the production of fried tortilla chips. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 3120-3126, 2001.

YAMAGUCHI, M. M.; HIROOKA, E. Y.; SHIBATA, T. M. M. Fumonisinas em milho no Estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7., São Paulo, 1992. **Anais...** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1992. p. 27.

YOSHIZAWA, T.; YAMASHITA, A.; LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high – and low-risk areas for human esophageal cancer in china. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1626-1629, 1994.

WILSON, T. M. et al. Fumonisin B₁ levels associated with and epizootic of equine leukoencephalomalacia. **Journal Vet. Diagn. Invest.**, v. 2, p. 213-216, 1990.

WILSON, T.J.; ROMER, T. R. Use of the Mycosep multifunctional cleanup column for liquid chromatographic determination of aflatoxins in agricultural products. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 74, n. 6, p. 951-956, 1991.

XIE, W.; MIROCHA, C. J.; CHEN, J. Detection of two naturally occurring structural isomers of partially hydrolysed fumonisin B₁ in corn by On-Line Capillary Liquid Chromatograph – Fast Atom Spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p.1251-1255, 1997.