

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIANA WAGNER DA ROCHA

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESPECTROMÉTRICA DA
MICOTOXINA CITREOVIRIDINA PRODUZIDA PELO *PENICILLIUM*
CITREONIGRUM EM MEIO DE CULTURA YES (*YEAST EXTRACT SUCROSE*)

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília.

Orientadora: Eloisa Dutra Caldas

BRASÍLIA
2013

MARIANA WAGNER DA ROCHA

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESPECTROMÉTRICA DA
MICOTOXINA CITREOVIRIDINA PRODUZIDA PELO *PENICILLIUM*
CITREONIGRUM EM MEIO DE CULTURA YES (*YEAST EXTRACT SUCROSE*)

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília.

Aprovada em 07 de março 2013

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE

Profa. Dra. Eloisa Dutra Caldas

Membro Interno do Programa

Universidade de Brasília

MEMBROS:

Profa. Dra. Marta Hiromi Taniwaki

Membro Externo do Programa

ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos

Profa. Dra. Maria Lucilia dos Santos

Membro Interno do Programa

Universidade de Brasília

SUPLENTE:

Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro

Membro Interno do Programa

Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho a Deus e
aos meus pais, pelo apoio e amor
incondicional*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por colocar tantas pessoas especiais no meu caminho.

Ao meu pai, Alexandre, e à Elayne, pelo apoio, carinho e cuidado em todas as horas e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

À minha mãe, Ana, pelo amor e pelas orações que sempre me confortaram. Aos meus irmãos pelo carinho.

À professora Eloisa Caldas pela orientação, apoio e disponibilidade em todas as etapas deste trabalho.

Ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

À professora Ines Resck pela ajuda com as análises de RMN, ensinamentos e paciência.

À professora Marta Taniwaki, Beatriz, Marina, Larissa, Taiane pelo treinamento e à todos os colegas do ITAL pela receptividade.

À professora Maria Fungaro, pela análise de identidade do fungo.

À professora Laila Espindola, pela ajuda e disponibilização de seu laboratório.

À Patrícia, Priscila e Juliana pela amizade, carinho e apoio.

À Neiva, Rúbia e toda sua família, pelo carinho.

À Diana, Denise, Érica pela auxílio nas análises e a todos os colegas do Labtox pelo carinho e companheirismo.

RESUMO

Micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos, podendo contaminar os alimentos no campo ou durante o armazenamento. A citreoviridina, micotoxina produzida principalmente por *Penicillium citreonigrum*, foi isolada pela primeira vez em 1947 no Japão durante investigações da doença do “arroz amarelo”, que causava beribéri cardíaco agudo. Em maio de 2006, surtos de beribéri foram notificados no Maranhão e amostras de arroz coletadas na região apresentaram *P. citreonigrum* e citreoviridina. O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para produção e purificação de citreoviridina com o intuito de obter material suficiente com alta pureza para conduzir estudos toxicológicos para auxiliar na elucidação do evento do Maranhão. Citreoviridina foi produzida pelo *P. citreonigrum* cultivado em 48 frascos de 500 mL de meio líquido YES durante 8 dias a 25°C e extraída com clorofórmio. A concentração de citreoviridina foi determinada por HPLC/PDA contra um padrão comercial. A toxina foi purificada por HPLC semi-preparativa, e caracterizada por UV/VIS, FT-IR, ¹H e ¹³C RMN, LC-MS/MS e LC-MSD TOF. Em média, 29,7 e 85,7 mg foram extraídas do líquido e micélio do meio de cultura YES, respectivamente, totalizando 5,5 g de citreoviridina em 15,3 g de extrato bruto. Aproximadamente 12,0 g desse extrato foram purificados, obtendo 3,2 g de citreoviridina purificada (27,1% de rendimento). As análises espectrométricas confirmaram a identidade da toxina purificada e as análises cromatográficas e gravimétrica confirmaram sua pureza (100%).

Palavras chave: micotoxinas, citreoviridina, produção, purificação, caracterização.

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi, which may develop in agricultural commodities in the field and/or during transport and storage. Citreoviridin, a mycotoxin produced mainly by *Penicillium citreonigrum*, was first isolated in 1947 in Japan during the investigation of the “yellow rice” disease, which caused acute cardiac beriberi. In May 2006, an outbreak of beriberi was reported in the State of Maranhão, Brazil, and rice samples collected in the region, was shown to be positive for *P. citreonigrum* and citreoviridin. The main objective of this work was to establish a protocol for the production and purification of citreoviridin in order to yield enough high purity material to conduct toxicological studies that would help to elucidate the events that occurred in Maranhão. Citreoviridin was produced by *P. citreonigrum* in 48 flasks of 500 mL YES liquid culture medium for 8 days at 25°C. The toxin was extracted with chloroform, purified by semi-preparative HPLC from the liquid medium and the mycelium of 48 culture flasks, and fully characterized by UV/VIS, FT-IR, ¹H and ¹³C NMR, LC-MS/MS and LC-MSD TOF. Citreoviridin concentration was determined by HPLC/PDA against a commercial standard. In average, 29.7 and 85.7 mg of citreoviridin were recovered from the liquid medium and mycelium, respectively, yielding a total of 5.5 g citreoviridin from 15.3 g of crude extract. About 12.0 g of this extract was purified yielding 3.2 g of purified citreoviridin (27.1% yield), which identity was confirmed by the spectrometric analyses. Chromatographic and gravimetric analysis showed that the purified citreoviridin was 100% pure.

Keywords: mycotoxins, citreoviridin, production, purification, characterization

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Sistema de Controle sugerido pelo Manual para aplicação do Sistema APPCC na prevenção e controle de micotoxinas elaborado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura.....	8
Figura 2. Mecanismo patogênico da morte celular pela inibição de enzimas TPP-dependentes na deficiência de tiamina.....	12
Figura 3. Distribuição dos casos de beribéri segundo o mês de notificação no Maranhão, de 2006 a 2008.....	14
Figura 4. Condições de armazenagem do arroz na região dos surtos de beribéri no Maranhão.....	15
Figura 5. <i>P. citreonigrum</i> (a) colônias cultivadas em CYA e MEA por 7 dias a 25°C; (b, c, d, e) penicilli, bar = 10 µm; (f) conídios, bar = 5 µm.....	18
Figura 6. Estruturas químicas da (a) citreoviridina e da (b) isocitreoviridina.....	20
Figura 7. Efeito de três fontes de luz em uma solução de citreoviridina: luz fluorescente e luz natural; somente luz fluorescente; luz incandescente de 90 W	20
Figura 8. Espectro eletromagnético.....	28
Figura 9. Transições entre os níveis de energia eletrônicos.....	29
Figura 10. Efeito da conjugação na posição e intensidade de absorção em um espectro de UV/Vis.....	31
Figura 11. Modos vibracionais associados a mudanças do momento dipolo detectáveis no Infravermelho.....	33
Figura 12. Modos vibracionais de H ₂ O (a) e CO ₂ (b).....	33
Figura 13. Frequências características dos grupos funcionais mais comuns em espectro IV.....	34
Figura 14. Núcleo em precessão em um campo magnético de magnitude B ₀	36
Figura 15. Deslocamento químico dos sinais de ¹ H e ¹³ C.....	38
Figura 16. Acoplamento spin-spin entre dois hidrogênios.....	38
Figura 17. Acoplamento spin-spin de hidrogênios, com constantes de acoplamento (J) semelhantes (esquerda) e diferentes (direita).....	39
Figura 18. Aspecto geral da espectrometria de massas.....	41

Figura 19. Ionização por eletrospray.....	41
Figura 20. (a) Analisador de massas com quadrupolo. Corrente contínua (U) e radiofrequência (V) (Dass, 2007). (b) Analisador de massas com triplo-quadrupolo.....	43
Figura 21. Modos de operação dos espectrômetros de massa em sequência....	44
Figura 22. Espectrômetro de massas por tempo de voo (TOF).....	45

PURIFICATION AND SPECTROMETRIC CHARACTERIZATION OF CITREOVIRIDIN PRODUCED BY *Penicillium citreonigrum* IN YEAST EXTRACT SUCROSE (YES) MEDIA

Figure 1. Citreoviridin and isocitreoviridin chemical structures.....	49
Figure 2. <i>P. citreonigrum</i> growth in YES medium with 4 and 8 days of incubation.....	55
Figure 3. Citreoviridin production by <i>Penicillium citreonigrum</i> cultivated in YES liquid medium at 25°C during 15 days. It was performed in duplicated (experiment 1 and 2).....	55
Figure 4. Citreoviridin extraction from the mycelium than from the liquid medium	57
Figure 5. Yield of citreoviridin in the crude extract on the batches.....	57
Figure 6. HPLC-PDA chromatogram under semi-preparative conditions of a YES culture medium inoculated with <i>Penicillium citreonigrum</i> . The fractions were monitored at 385 nm.....	58
Figure 7. HPLC-PDA chromatograms (385 nm) of crude extract fractions obtained from a semi-preparative column.....	59
Figure 8. UV-spectrum of Purified citreoviridin (5 µg/mL) in methanol.....	60
Figure 9. Infrared spectrum of the purified citreoviridin (fraction 4).....	61
Figure 10. The ¹³ C NMR spectra (75.46 MHz) of (a) crude toxin extract and (b) purified citreoviridin in CD ₃ OD.....	63
Figure 11. The ¹ H NMR spectra of (a) Crude toxin extract and (b) Purified citreoviridin at 300 MHz in CD ₃ OD.....	64
Figure 12. Product ion scan obtained by LC-MS/MS of the purified citreoviridin 403.2 m/z ([M+H] ⁺).....	65
Figure 13. Citreoviridin (m/z 403.2) fragmentation, with a neutral loss of 88 Da, resulting in the m/z 315.0 fragment.....	66

Figure 14. LC-MS/MS chromatogram of fraction 2 stored for about 10 months at -15 °C in amber flask..... 67

Figure 15. LC-MS/MS chromatogram of purified citreoviridin (Fraction 4) stored for about 10 months at -15 °C in amber flask..... 68

LISTA DE QUADROS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1. Principais micotoxinas, seus principais fungos produtores e alimentos fonte de contaminação.....	5
Quadro 2. Limites Máximos Tolerados (LMT) em vigor de 2012 a 2014 para micotoxinas e as respectivas categorias de alimentos.....	10
Quadro 3. Métodos de produção de citreoviridina.....	22
Quadro 4. Principais características dos métodos analíticos para citreoviridina...	24
Quadro 5. Absorções típicas de cromóforos isolados simples.....	30

LISTA DE TABELAS

PURIFICATION AND SPECTROMETRIC CHARACTERIZATION OF CITREOVIRIDIN PRODUCED BY *Penicillium citreonigrum* IN YEAST EXTRACT SUCROSE (YES) MEDIA

Table 1. Production of citreoviridin by <i>P. citreonigrum</i> in YES medium grown for 8 days at room temperature.....	54
Table 2. NMR data of purified citreoviridin dissolved in CD ₃ OD and CD ₂ Cl ₂	60
Table 3. Measured mass of commercial standard, purified citreoviridin (fraction 4) and fraction 2 obtained by LC-MSD TOF, and mass accuracy attributed to molecular formula C ₂₃ H ₃₀ O ₆ (theoretical mass 402.2042).....	64

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPA	Boas Práticas Agrícolas
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
COSY	<i>COrrrelation SpectroscopY</i>
CYA	<i>Czapek yeast extract Agar</i>
DL₁₀₀	Dose letal para 100% dos animais testados
DL₅₀	Dose letal para 50% dos animais testados
ESI	<i>Electrospray interface</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC/DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência/detector de arranjo de diodos
HPLC/FL	Cromatografia líquida de alta eficiência/detector de fluorescência
HPLC/UV	Cromatografia líquida de alta eficiência/detector ultravioleta
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IR	<i>Infrared Spectrometric</i>
IV	Infravermelho
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LMT	Limites Máximos Tolerados
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MEA	<i>Malt extract agar</i>
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rt	Tempo de retenção
SPE	Extração em fase sólida
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Tempo de voo
TPP	Tiamina pirofosfato
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta/visível
YES	<i>Yeast Extract Sucrose</i>
YESA	<i>Yeast Extract Sucrose Agar</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1 FUNGOS E MICOTOXINAS	3
1.1 Micotoxinas em Alimentos: Controle e Legislação	7
2 BERIBERI	11
2.1 Casos de Beribéri no Maranhão.....	13
3 CITREOVIRIDINA.....	16
3.1 Fungos Produtores de Citreoviridina.....	17
3.2 Características Físico-químicas da Citreoviridina	19
3.3 Produção de Citreoviridina	21
3.4 Ocorrência de Citreoviridina em Alimentos	23
3.5 Toxicologia da Citreoviridina	25
4 ESPECTROSCOPIA MOLECULAR.....	27
4.1 Espectrometria no Ultravioleta/Visível.....	28
4.2 Espectrometria no Infravermelho	32
4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	35
4.4 Espectrometria de Massas.....	40
OBJETIVOS	46
PURIFICATION AND SPECTROMETRIC CHARACTERIZATION OF CITREOVIRIDIN PRODUCED BY <i>Penicillium citreonigrum</i> IN YEAST EXTRACT SUCROSE (YES) MEDIA.....	47
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	73
REFERÊNCIAS.....	74

INTRODUÇÃO

Muitos alimentos são suscetíveis ao ataque fúngico que pode ocorrer no campo e/ou durante seu transporte e armazenamento. Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos ao homem e animais produzidos por fungos dos gêneros *Claviceps*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria*, principalmente (D'mello, 2003). Muitas micotoxinas e fungos toxigênicos foram descobertos por sua associação a doenças que afetaram humanos (ergotismo, doença do “arroz amarelo”, aleucia tóxica alimentar, nefropatia endêmica Balcânica) ou animais (doença “Turkey-X”, nefropatia Porcina, leucoencefalomalácia) (Kuiper-Goodman, 2004).

Citreoviridina é uma micotoxina produzida por diversas espécies de *Penicillium*, sendo o principal produtor o *Penicillium citreonigrum*. Esta toxina foi descoberta em 1947 no Japão durante investigações da doença do “arroz amarelo”, que causava beribéri cardíaco agudo em humanos, também conhecido como “Shoshin-kakke”. Essa doença prevaleceu no Japão durante três séculos e desapareceu em 1929 (Pitt e Hocking, 2009a). Testes toxicológicos com o extrato do “arroz amarelo” contaminado com citreoviridina causaram os mesmos sintomas observados no beribéri cardíaco agudo em diferentes animais, levando à caracterização do beribéri cardíaco agudo como uma micotoxicose (Uraguchi, 1969). Alguns estudos também mostram que a citreoviridina atua como inibidor específico da adenosina trifosfato e da tiamina difosfato (Datta e Ghosh, 1981), sugerindo que a toxina possui um efeito anti-tiamina, o que reforçaria sua associação com o beribéri cardíaco.

Em maio de 2006, surtos de beribéri começaram a ser relatados no Maranhão, e até 2008, 1207 casos da doença e 40 óbitos haviam sido notificados nesse estado (Padilha, Fujimori et al., 2011). Diversas espécies de fungos foram isoladas de amostras de arroz coletadas na região, inclusive o *Penicillium citreonigrum*, e cinco delas estavam contaminadas com citreoviridina (Rosa, Keller et al., 2010). Porém, a associação dos casos de beribéri com o consumo de arroz contaminado com citreoviridina não foi confirmada (Lima, Porto et al., 2010). Mais estudos toxicológicos com a citreoviridina deverão ser realizados para entender melhor seu mecanismo de ação e talvez explicar os eventos ocorridos no Maranhão. Estes estudos são necessários para se estabelecer uma dose segura de exposição

humana pelo consumo de alimento e demandam uma quantidade considerável de toxina pura. O custo da citreoviridina no mercado é alto (R\$ 1.416,00/5 mg), o que tornaria inviável a realização destes estudos toxicológicos sem uma produção independente da toxina.

O presente trabalho é composto por uma revisão bibliográfica sobre aspectos relevantes do tema, objetivos gerais e específicos, um artigo científico a ser submetido em um periódico de língua inglesa, conclusões e perspectivas futuras.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 FUNGOS E MICOTOXINAS

Os fungos são extensamente distribuídos na natureza e têm evoluído ao longo do tempo para colonizar uma vasta gama de ecossistemas. Parte desse processo envolve também a habilidade de produzir uma gama de substâncias extracelulares conhecidos como metabolitos secundários. Alguns fungos produzem metabolitos secundários úteis para uso farmacêutico (como por exemplo, a penicilina, a ciclosporina e as estatinas), outros produzem metabólitos tóxicos, coletivamente conhecidos como micotoxinas (Magan e Aldred, 2007).

Classicamente, acredita-se que os metabolitos primários sejam aqueles essenciais para o crescimento do microrganismo produtor, enquanto que os secundários não aparentam ter uma relação direta com o crescimento ou metabolismo (Jay, Loessner et al., 2005). Muitos desses metabólitos têm sua função desconhecida. Acredita-se que as micotoxinas, de maneira geral, são produzidas em resposta a mudanças ambientais, geralmente devido ao surgimento de condições de estresse. Em condição de estresse há maior necessidade de uma vantagem competitiva, e é quando as micotoxinas, provavelmente, se tornam importantes para o fungo produtor. Nos sistemas naturais, o meio ecológico determina a estrutura da comunidade e para uma espécie tornar-se predominante, ela pode depender de uma tolerância ao estresse e da habilidade em produzir uma bateria de metabolitos secundários que podem ter diferentes funções contra os demais microrganismos (Magan e Aldred, 2007).

Embora o mecanismo da relação entre produção de micotoxinas e desenvolvimento do fungo ainda não esteja totalmente elucidado, sabe-se que a maioria das micotoxinas é produzida por organismos que exibem crescimento filamentoso, tem morfologia complexa e muitas vezes estão associados ao processo de esporulação (Calvo, Wilson et al., 2002).

Os fungos dos gêneros *Claviceps*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria* são produtores das principais micotoxinas de interesse para agricultura e para saúde humana (D'mello, 2003; Nicholson, 2004). A maioria destes fungos infectam as plantas antes da colheita, podendo ser considerados como

fitopatógenos, enquanto outros se tornam ativos durante o armazenamento, quando as condições forem permissivas ao crescimento fúngico (Nicholson, 2004).

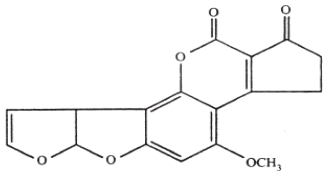
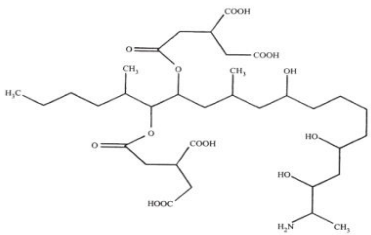
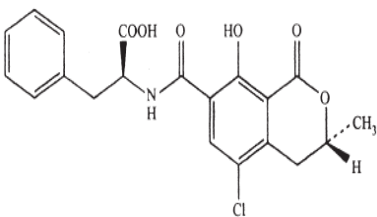
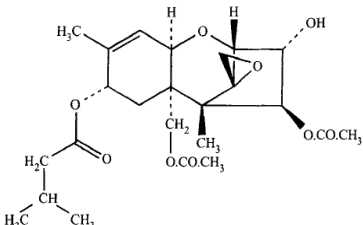
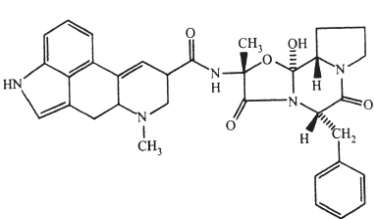
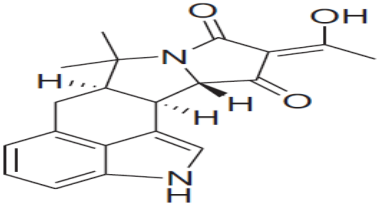
Muitos cereais e outras culturas são susceptíveis ao ataque por fungos produtores de micotoxinas. Os níveis de micotoxinas variam muito de cultura para cultura, de ano para ano, e dependem de condições que favorecem a invasão do fungo e seu crescimento nos alimentos (Kuiper-Goodman, 2004), incluindo atividade de água, pH, temperatura, teor de gases (principalmente oxigênio e dióxido de carbono), consistência do alimento, conteúdo nutricional e presença de conservantes ou inibidores do crescimento (Pitt e Hocking, 2009b).

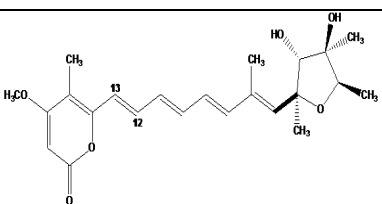
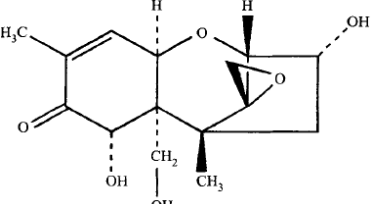
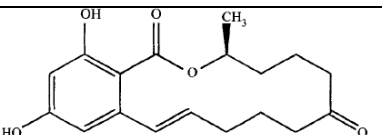
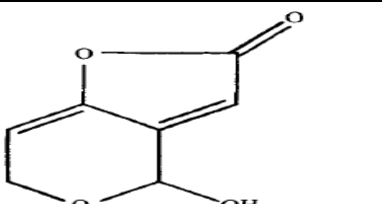
As micotoxinas são caracterizadas por estruturas químicas diferenciadas, como resultado das múltiplas variedades de fungos responsáveis pela sua produção. Uma micotoxina pode ser produzida por diferentes gêneros e espécies de fungos e um fungo específico pode produzir mais do que uma micotoxina (Brera, De Santis et al., 2008).

A presença de micotoxinas nos alimentos pode ocorrer mesmo quando não há infestação fúngica visível, o que pode ser devido, por exemplo, ao término do ciclo vital do microrganismo ou pela remoção do fungo pelo processamento do alimento. E também ao contrário, a presença de um fungo no alimento não significa presença de micotoxinas (Brera, De Santis et al., 2008).

Já são conhecidas mais de 300 micotoxinas, e seus efeitos tóxicos mais relatados são genotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade, nefrotoxicidade e teratogenicidade (Nicholson, 2004; Brera, De Santis et al., 2008). Algumas delas são classificadas pela Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer (IARC - *International Agency for Research on Cancer*) como carcinogênicas ou possíveis carcinogênicas ao homem (IARC, 2002). O Quadro 1 apresenta as principais micotoxinas, seus principais fungos produtores e alimentos fonte de contaminação.

Quadro 1 - Principais micotoxinas, seus principais fungos produtores e alimentos fonte de contaminação.

Micotoxinas	Estruturas químicas	Efeito ao homem	Fungos produtores	Alimentos
Aflatoxinas	 Aflatoxina B₁¹	Câncer de fígado ^{3,4} ; hepatite aguda	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. Parasiticus</i> ; <i>A. nominus</i>	Castanha, milho, amendoim
Fumonisin	 Fumonisin B₁¹	Câncer de esôfago ⁴ , mal formação do tubo neural	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Milho
Ocratoxinas	 Ochratoxina A¹	Nefropatia Endêmica dos Balcãs; Câncer renal ⁴	<i>A. ochraceus</i> ; <i>Penicillium verrucosum</i> ; <i>A. carbonarius</i>	Cereais, café, uva
Toxina T-2	 Toxina T-2¹	Aleucia tóxica alimentar	<i>F. sporotrichioides</i> ; <i>F. Poae</i>	Cereais
Alcaloides do Ergot	 Ergotamina¹	Ergotismo (<i>St Anthony's Fire</i>)	<i>Claviceps purpurea</i>	Centeio
Ácido ciclopiazônico	 α-ácido ciclopiazônico²	"Kodua poisoning"	<i>A. tamarii</i> , <i>A. flavus</i> ; <i>P. commune</i>	Castanhas

Micotoxinas	Estruturas químicas	Efeito ao homem	Fungos produtores	Alimentos
Citreoviridina	 Citreoviridina	Beribéri cardíaco; “Shoshin-kakke”	<i>P. citreonigrum</i>	Arroz, milho
Desoxinivalenol	 Desoxinivalenol¹	Não relatado	<i>F. graminearum</i> ; <i>F. culmorum</i>	Trigo, cereais
Zearalenona	 Zearalenona¹	Não relatado	<i>F. graminearum</i> ; <i>F. culmorum</i> ; <i>F. equiseti</i>	Milho, trigo
Patulina	 Patulina¹	Não relatado	<i>A. clavatus</i> ; <i>P. expansum</i>	Maçã, suco de maçã

¹ Fonte: Moss, 1996; ² Fonte: Griffiths-Jones, Knight, 2011; ³ Carcinogênica ao homem (IARC, 2002).

⁴ Possível carcinogênica ao homem (IARC, 2002).

Algumas micotoxinas provocam toxicidade aguda, algumas toxicidade crônica e outras ambas. Além disso, é possível que uma mistura de micotoxinas possa atuar sinergicamente ou aditivamente, então, é muito importante identificar as micotoxinas presentes no alimento e também a microbiota a nível de espécie, já que diferentes espécies têm diferentes perfis de produção de micotoxinas (Frisvad, Thrane et al., 2007). Porém, em nossas condições atuais isso não é possível, já que a maioria dos métodos analíticos disponíveis se limita a análise de apenas algumas micotoxinas e para determinadas culturas.

A preocupação com os efeitos para saúde do homem, principalmente devido a uma exposição crônica a essas micotoxinas, levou ao estabelecimento de medidas de controle da contaminação dos alimentos.

1.1 Micotoxinas em Alimentos: Controle e Legislação

A contaminação dos alimentos por micotoxinas é um problema mundial. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) estima que até 25% da produção agrícola mundial esteja contaminada por micotoxinas. A ocorrência dessa contaminação é mais frequente nos países de clima tropical, como resultado das condições ambientais mais favoráveis ao desenvolvimento de fungos nas áreas de plantio, junto com condições inapropriadas de colheita e armazenamento (FAO, 2004; Kabak, 2010).

Varias estratégias são usadas na tentativa de reduzir os níveis de micotoxinas nos alimentos. As mais utilizadas, envolvem a implantação de Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Neste sentido, a FAO publicou o manual para aplicação do sistema APPCC e o Codex Alimentarius, o Código de Práticas para prevenção e redução da contaminação de micotoxinas em cereais e outras matrizes, incluindo aflatoxinas, patulina, ocratoxina A, zearalenona, fumonisinas e tricotecenos (Codex, 2012). A Figura 1 apresenta as principais medidas a serem utilizadas em um Sistema de Controle de micotoxinas nos alimentos sugeridas pelo manual (FAO, 2001).

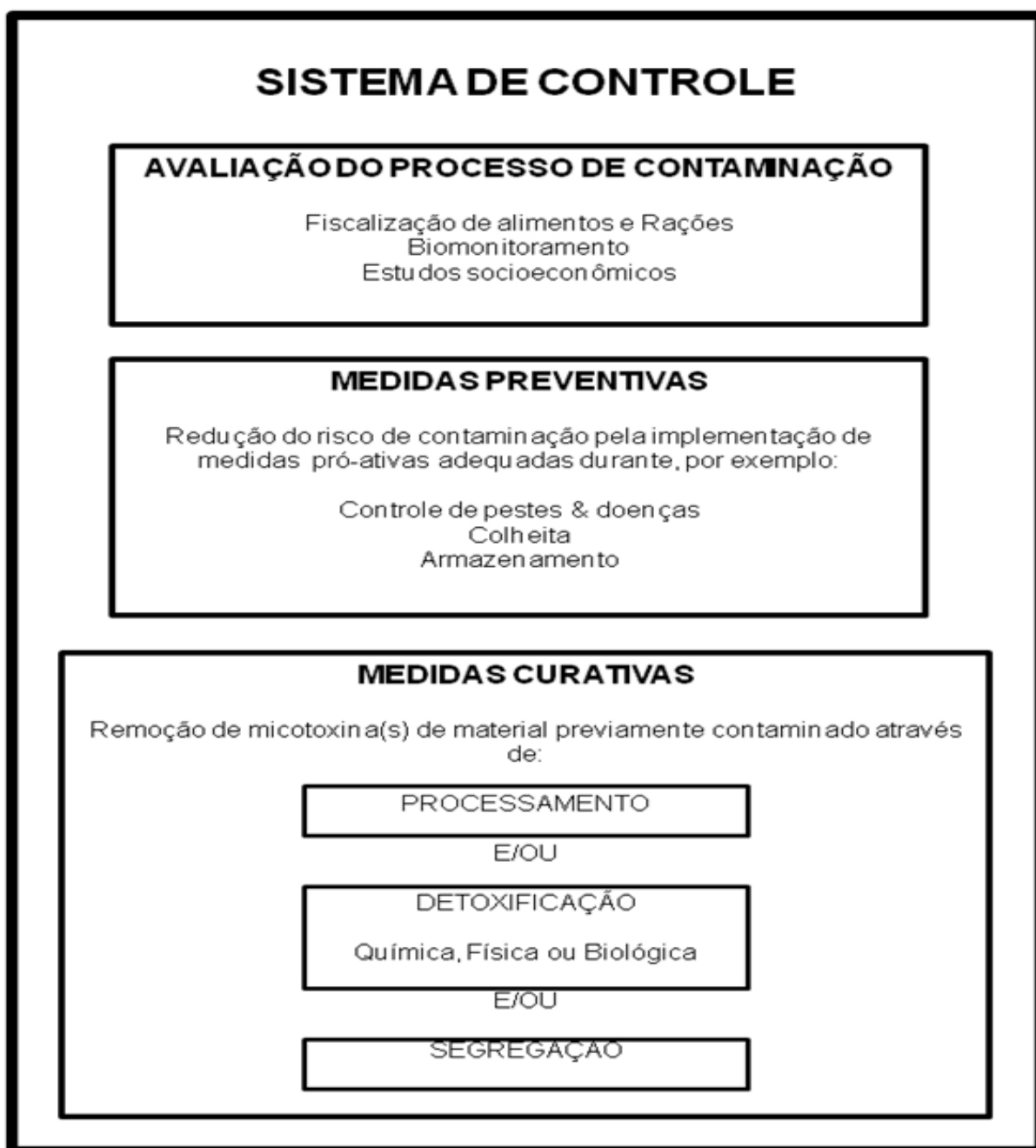


Figura 1 – Sistema de Controle sugerido pelo Manual para aplicação do Sistema APPCC na prevenção e controle de micotoxinas elaborado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2001).

Dentre as ferramentas existentes, as mais efetivas para reduzir os níveis de micotoxinas nos alimentos são aquelas que dizem respeito às práticas de prevenção da contaminação por micotoxinas nos períodos de pré ou pós-colheita. A combinação do desenvolvimento de culturas resistentes aos fungos toxigênicos e o

biocontrole utilizando agentes competitivos não-toxigênicos é uma das estratégias mais efetivas para prevenir a formação das micotoxinas produzidas no campo (antes da colheita). Para as micotoxinas produzidas durante o armazenamento (pós-colheita), a importância da secagem e do controle da umidade durante o armazenamento é geralmente bem entendida pela indústria, em termos de prevenção da contaminação fúngica (Kabak, 2010).

Quando há falhas na prevenção ao ataque fúngico e à produção de toxinas no campo ou no armazenamento, os riscos a saúde do consumidor e as perdas econômicas são inevitáveis. E então, para prevenir e/ou reduzir a exposição humana e animal às micotoxinas, seriam necessários métodos práticos, seguros e efetivos de descontaminação de micotoxinas nos alimentos. Porém, atualmente não existe nenhum método que consiga destruir toda a micotoxina presente no alimento sem deixar seus metabólitos (que muitas vezes também são tóxicos) e sem mudar o valor nutricional do alimento (Kabak, 2010).

Depois de formada a micotoxina, é difícil eliminá-la totalmente do alimento e então, outra fase do controle de micotoxinas se torna importante: a fiscalização dos alimentos. Os órgãos legisladores de cada país estabelecem Limites Máximos Tolerados (LMT) para presença de micotoxinas em determinados alimentos. Ao menos 99 países já tem regulamentação para micotoxinas, cuja população representa cerca de 90% dos habitantes do mundo. Ao mesmo tempo, várias regulamentações têm sido harmonizadas entre países pertencentes a comunidades econômicas (Austrália/Nova Zelândia, União Europeia, MERCOSUL) (FAO, 2004). A última legislação no Brasil, a RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011, estabeleceu LMT para 11 micotoxinas em diferentes tipos de alimentos (Quadro 2) e prevê redução nos LMT de algumas micotoxinas até 2016 e inclusão de maior número de alimentos (Brasil, 2011).

Quadro 2 – Limites Máximos Tolerados (LMT) em vigor de 2012 a 2014 para micotoxinas e as respectivas categorias de alimentos (Brasil, 2011).

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Aflatoxina M1	Leite fluido	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias: <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta decaiena e pimentão-doce); <i>Piper</i> spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) <i>Myristica fragrans</i> (nozmoscada) <i>Zingiber officinale</i> (gingibre) <i>Curcuma longa</i> (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20
Ocratoxina A	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
	Feijão	10
	Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10
	Vinho e seus derivados	2
	Suco de uva e polpa de uva	2
	Especiarias: (idem Aflatoxinas)	30
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil	2
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Amêndoa de cacau	10
Desoxinivalenol	Frutas secas e desidratadas	10
	Arroz beneficiado e derivados	750
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil	200
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	2000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	1750
Fumonisinias B1 +B2	Milho de pipoca	2000
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil	200
	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	2500
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	2000
Zearalenona	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil	20
	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	200
	Arroz beneficiado e derivados	200
	Arroz integral	800
Patulina		50

Nem todas as micotoxinas são abrangidas nas legislações, e algumas delas estão com LMT estabelecidos acima do que seria ideal para não provocar efeitos tóxicos nos homens. Vários fatores, de natureza científica e socioeconômica, podem influenciar o estabelecimento de LMT incluindo a disponibilidade de dados toxicológicos, disponibilidade de métodos analíticos para análise de micotoxinas em alimentos, disponibilidade de dados de ocorrência, disponibilidade de alimentos para a população e impacto econômico (Egmond e Jonker, 2004; FAO, 2004).

2 BERIBERI

Beribéri é causado por uma deficiência de tiamina, também conhecida como vitamina B₁. Manifestações clássicas da deficiência de tiamina causam comprometimento cardiovascular, neurológico (cerebral e periférico) e acidose láctica (Thurnham, 2009).

Os principais fatores que contribuem para deficiência de tiamina são deficiência nutricional, alcoolismo, demanda metabólica e/ou fisiológica aumentada, absorção reduzida e aumento da eliminação de tiamina. A tiamina é encontrada em muitos alimentos (cereais integrais, grãos, carnes), porém sua reserva no organismo é baixa e alguns tipos de processamento (como cozimento e beneficiamento dos grãos) diminuem o teor de tiamina nos alimentos. A necessidade de tiamina é proporcional à ingestão calórica da dieta, e varia entre 1,0 a 1,5 mg/dia para adultos em condições normais do organismo (Thurnham, 2009; Fattal-Valevski, 2011).

A tiamina pode estar disponível no corpo humano na forma livre ou fosforilada. A tiamina pirofosforilada ou difosforilada (TPP) é a forma ativa da tiamina e atua como cofator para várias enzimas envolvidas no metabolismo energético. A Figura 2 apresenta a patogênese da morte celular em decorrência da inibição da atividade das enzimas TPP-dependentes na deficiência de tiamina (Fattal-Valevski, 2011).

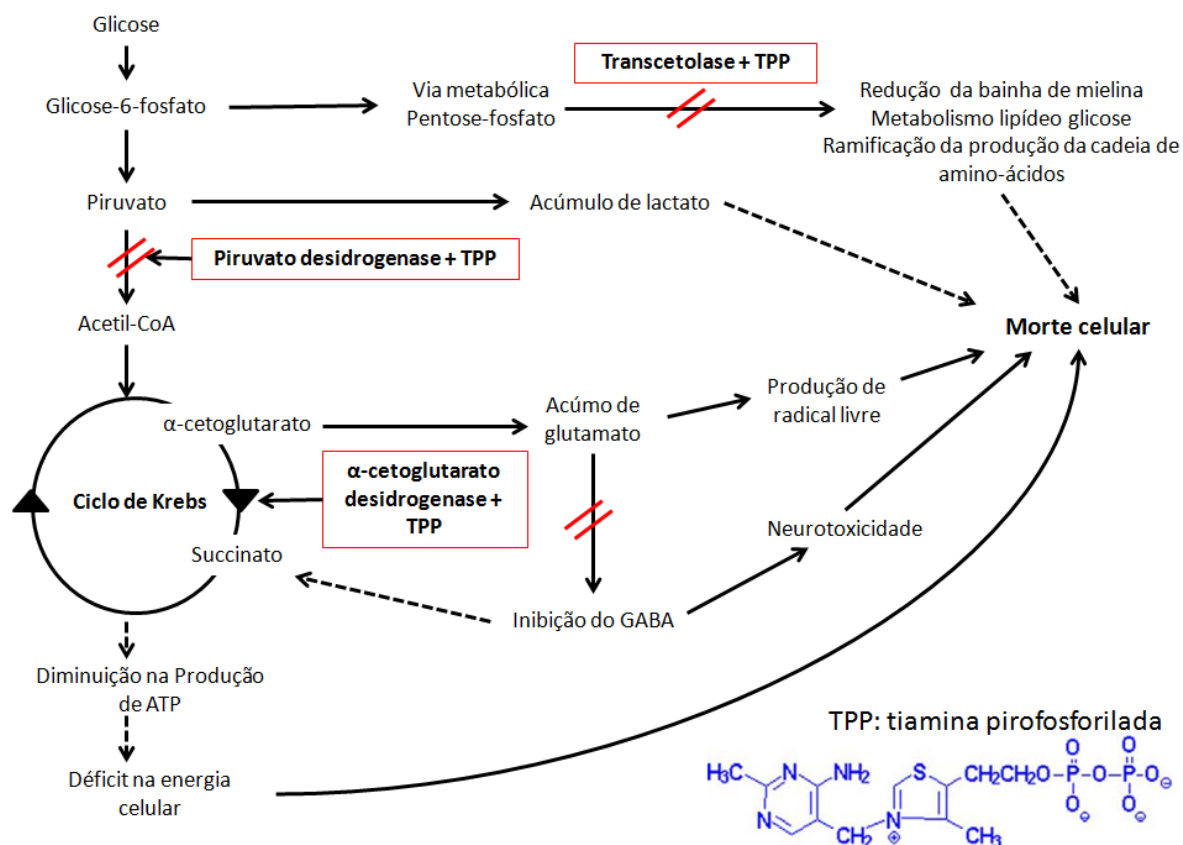


Figura 2 - Mecanismo patogênico da morte celular pela inibição de enzimas TPP-dependentes na deficiência de tiamina (adaptado de Fattal-Valevski, 2011).

Existem quatro principais manifestações clínicas de beribéri: beribéri úmido e beribéri Shoshin, que afetam principalmente o sistema cardiovascular e, beribéri seco e Síndrome de Wernick-Korsakoff, que afetam o sistema nervoso (Thurnham, 2009).

Beribéri úmido geralmente se manifesta de forma subaguda e causa insuficiência cardíaca de alto débito com vasodilatação periférica e extremidades quentes. A doença ocorre de forma sazonal nas áreas endêmicas e o paciente responde rapidamente ao tratamento com tiamina. Beribéri Shoshin é uma forma mais rápida do beribéri úmido, onde a doença aparece de forma aguda, com vasodilatação, choque e morte súbita (Thurnham, 2009; Fattal-Valevski, 2011).

O beribéri seco é um tipo crônico e os principais sintomas são fraqueza, dores musculares, dificuldade de caminhar, deficiência nos nervos sensoriais e nos reflexos, e paralisia flácida dos nervos motores. Afeta principalmente os membros inferiores causando parestesia dos pés, câimbras na panturrilha e dores nas pernas, podendo evoluir para os membros superiores. Neste tipo da doença há pouca ou

nenhuma resposta ao tratamento com tiamina (Thurnham, 2009; Fattal-Valevski, 2011).

A Síndrome de Wernick-Korsakoff combina a encefalopatia descrita por Wernick, caracterizada por sintomas como letargia, oftalmoplegia, ataxia, e comprometimento mental, com a “paralisia alcoólica”, amnésia de certos casos de alcoolismo crônico, descrita por Korsakoff (Sullivan e Fama, 2012). Em um estágio avançado da doença, o paciente pode apresentar delírios, psicose, confabulações, e problemas cognitivos e de memória e em casos graves, convulsões e coma, podendo levar a morte (Fattal-Valevski, 2011). Os sintomas de encefalopatia de Wernick respondem rapidamente ao tratamento com tiamina, mas a psicose de Korsakoff responde lentamente ou não responde ao tratamento (Thurnham, 2009).

2.1 Casos de Beribéri no Maranhão

Em 2006, surtos de beribéri começaram a ser relatados no Maranhão, e até 2008, 1.207 casos e 40 óbitos foram notificados. Os casos de beribéri atingiram 57 municípios maranhenses, localizados na região oeste e central do estado. Os óbitos ocorreram quase todos entre homens, na faixa etária de 20 e 30 anos (72,5%), que residiam em área urbana (80%), 66,7% deles eram fumantes e 75% declaram consumir álcool. A forma clínica predominante foi o beribéri seco (87,4%), 52 casos foram diagnosticados como beribéri úmido e 6 como Shoshin. Houve uma distribuição sazonal dos casos, concentrando-se entre os meses de maio e agosto (Figura 3) (Padilha, Fujimori et al., 2011).

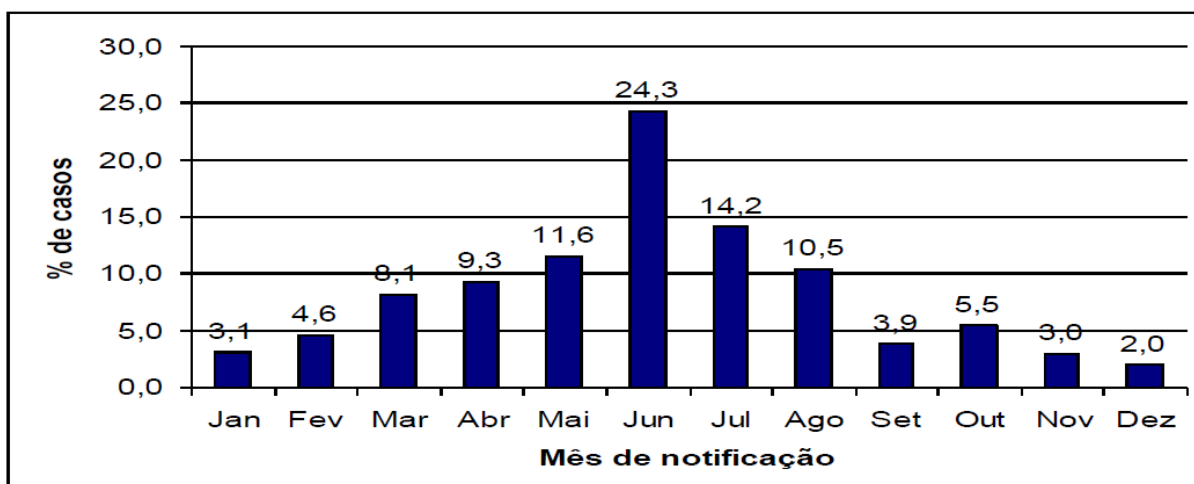


Figura 3 - Distribuição dos casos de beribéri segundo o mês de notificação no Maranhão, de 2006 a 2008 (cada barra corresponde a soma dos casos de cada mês dos 3 anos) (Padilha, 2010).

Por se tratar de uma região onde o consumo de arroz é alto, foram coletadas 420 amostras de 21 tipos diferentes de arroz de 35 regiões do Maranhão, levando em consideração o número de casas e/ou locais de processamento de arroz. A coleta foi realizada em áreas onde a produção de arroz é muito rudimentar, os lugares de armazenamento pós-colheita são precários (Figura 4) favorecendo a proliferação de fungos, a população é economicamente vulnerável e seu principal alimento é o arroz. Os resultados deste estudo mostraram que as amostras exibiram alta contagem de fungos de diferentes gêneros, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*. Onze cepas de *Penicillium citreonigrum* foram encontradas, destas, dez foram capazes de produzir citreoviridina. Cinco amostras de arroz estavam contaminadas com citreoviridina, e seu isômero isocitreoviridina foi encontrada em duas delas. Os níveis mais altos de contaminação foram encontrados em amostras de farelo de arroz (128 e 254 ng/g) (Rosa, Keller et al., 2010).



Figura 4 - Condições de armazenagem do arroz na região dos surtos de beribéri no Maranhão (Keller, 2010).

Na região dos surtos também foi realizado estudo de caso-controle, onde caso foi uma pessoa que teve beribéri e controle, seu vizinho, resultando em um total de 90 casos e 90 controles avaliados neste estudo. Amostras de arroz foram coletadas na casa de cada caso e de cada controle. Em uma análise univariada, beribéri foi associado com sexo masculino, consumo de álcool, hábito de fumar, atividade física e consumo de arroz de agricultura de subsistência. Os níveis de tiamina, transaminase e creatina quinase foram dentro do normal para ambos, casos e controles. Nas amostras de arroz coletadas foram isolados fungos como, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (produtores de aflatoxinas), *A. niger* (produtor de ocratoxina A) e *Penicillium citrinum* (produtor de citrinina), nenhum produtor de citreoviridina foi encontrado nestas amostras (Lima, Porto et al., 2010).

Medidas de controle de novos casos da doença foram tomadas, como a substituição do arroz, preparo de cartilhas e guias, como o guia de assistência e atenção nutricional aos casos de beribéri (Ministério da Saúde, 2012) e o guia de Boas Práticas Agrícolas (BPA) na cadeia produtiva do arroz produzido pelos pequenos agricultores do Maranhão (OPAS, 2009), porém os casos de beribéri continuam sendo notificados na região.

O monitoramento da contaminação do arroz, não só no Maranhão, mas em todo o país, é muito importante, visto o alto consumo deste alimento no Brasil (160,3 g/ dia/*per capita*) (IBGE, 2011).

3 CITREOVIRIDINA

A citreoviridina é uma micotoxina neuro e cardiotoxica descoberta durante as investigações do beribéri cardíaco agudo (“Shoshin-kakke”), também conhecido como doença do “arroz amarelo” no Japão. Os primeiros casos da doença surgiram no final do século 17 e aumentaram com mudanças nos hábitos alimentares, com o aperfeiçoamento da tecnologia no preparo do arroz, estocagem e transportes nas cidades e o aumento do consumo de arroz polido. A doença geralmente se desenvolvia muito rapidamente, e uma vez iniciada, não havia meios na época de salvar o paciente, que ia a óbito em três dias após paralisia repentina seguida de rápido desenvolvimento de dano cardiovascular e falência respiratória. As vítimas eram geralmente homens jovens, a maioria saudável ou em alguns casos com leves sinais de paresia ou edema (Uraguchi, 1969).

A causa do beribéri cardíaco agudo, que prevaleceu no Japão durante três séculos, era desconhecida. Em 1918, Miyake, um micologista japonês, iniciou uma linha de pesquisa para essa doença, relacionando arroz, fungos e toxina. Depois de mais de 20 anos de pesquisa, ele e seus colaboradores descobriram o primeiro arroz mofado tóxico, que chamaram de arroz amarelo, de onde isolaram o *Penicillium toxicarium* Miyake, que mais tarde foi identificado como *P. citreoviride* Biourge. Estudos toxicológicos mostraram que os efeitos tóxicos do extrato de arroz mofado causavam em vários animais os mesmo sintomas descritos nos casos de beribéri cardíaco agudo em humanos (Uraguchi, 1969). A associação com o consumo de arroz contaminado com citreoviridina foi bem aceita e a citreoviridina foi considerada o fator causal da doença (Pitt e Hocking, 2009a).

Uraguchi (1969) observou que em 1910 houve uma queda repentina no número de casos de beribéri, ano em que houve um brusco aumento das inspeções de qualidade do arroz, excluindo-se do comercio japonês o arroz de má qualidade ou mofado. O autor lembrou que a vitamina B₁ só foi descoberta um ano depois e o uso dela como terapia médica só ocorreu 10 anos mais tarde, mostrando que a

queda na incidência do beribéri foi devido a diminuição da exposição à toxina presente no arroz.

A citreoviridina também tem sido relacionada à doença de Keshan, uma cardiomiopatia que afeta principalmente crianças e mulheres jovens e é caracterizada por episódios agudos ou crônicos de problemas no coração. O primeiro relato da doença foi feito em Keshan (China) no inverno de 1935, e eventos similares foram notificados posteriormente em outras áreas rurais da China e em parte da Coreia do Norte (Sun, 2010). Na hipótese de Sun (2010) a citreoviridina é o fator primário da doença, principalmente por meio de mecanismo de estresse oxidativo pelo consumo por um longo período de cereais mofados. Fatores adicionais como dieta deficiente em selênio, proteínas, vitaminas C e E poderiam agravar os danos, enquanto que os fatores estimulantes, como estresse emocional, fadiga, frio, calor, sobrepeso, hábito de fumar, poderiam acelerar o aparecimento das manifestações clínicas. Estudos toxicológicos em animais mostraram as mesmas alterações no miocárdio das pessoas que sofreram a doença de Keshan (Liu, Wang et al., 2007; Hong, Huang et al., 2010).

3.1 Fungos Produtores de Citreoviridina

Penicillium citreonigrum Dierckx (sinônimos: *Penicillium citreoviride* Biourge e *Penicillium toxicarium* L. Miyake) é o principal fungo produtor de citreoviridina. Produz colônias amarelas compactas com crescimento lento, com diâmetro de 20 a 28 mm quando cultivadas em CYA (*Czapek Yeast Extract Agar*) e MEA (*Malt Extract Agar*). As colônias frequentemente apresentam pigmentos amarelos e um reverso amarelo intenso. Esta espécie é classificada no subgênero *Aspergilloides*, já que os fungos são pequenos e monoverticilados com estipes delicadas e com paredes lisas. Os conídios são pequenos, esféricos e lisos com diâmetro de 1,8 a 2,8 µm (Figura 5). A temperatura ótima de crescimento do fungo é entre 27 e 30 °C, mas a produção de citreoviridina é maior em temperaturas mais baixas. A atividade de água ótima para o crescimento do fungo é 0,90 e a mínima ainda não é conhecida, mas esta espécie é provavelmente xerófila (Pitt, 2006; Ji, Zhu et al., 2007; Pitt e Hocking, 2009a).

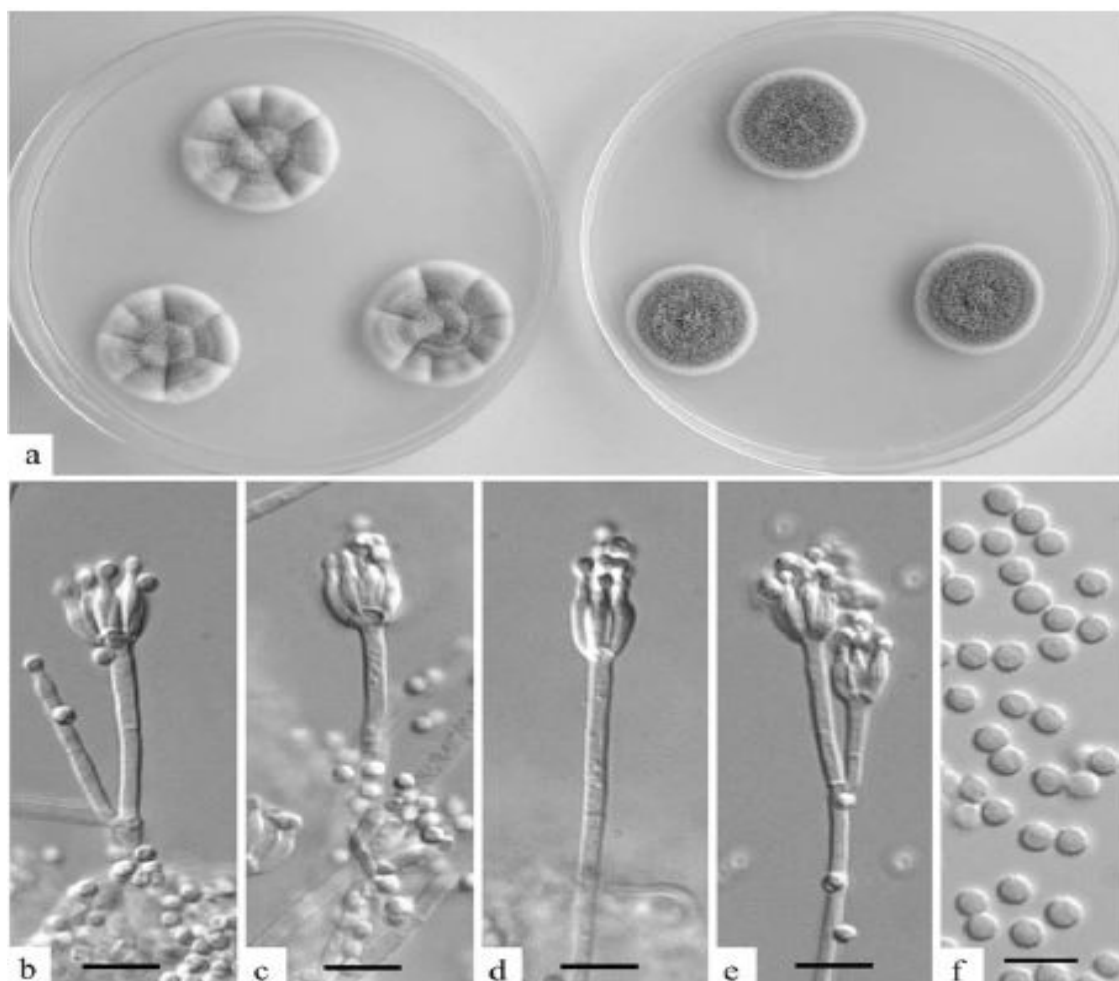


Figura 5 - *P. citreonigrum* (a) colônias cultivadas em CYA e MEA por 7 dias a 25°C; (b, c, d, e) penicilli, bar = 10 µm; (f) conídios, bar = 5 µm (Pitt e Hocking, 2009a).

Embora não seja uma espécie comumente isolada, *P. citreonigrum* é largamente distribuído. Sua ocorrência como causa de contaminação do arroz no Japão tem sido bem referida de tempos em tempos. No Brasil, recentemente, o fungo foi isolado de amostras de arroz coletadas no Maranhão (Rosa, Keller et al., 2010). Outros autores relataram a presença de *P. citreonigrum* em outros grãos (Graves e Hesseltine, 1966; Aziz, Mattar et al., 2006; Njobeh, Dutton et al., 2009; Pitt e Hocking, 2009a), feijão verde (Pitt, Hocking et al., 1994) e uva passas (Romero, Comerio et al., 2005). O fungo foi também encontrado em fabricas de queijo (Kure, Skaar et al., 2004), amostras de solo de plantação de milho (Nesci, Barros et al., 2006), e em cortiça utilizada para a fabricação de rolhas de vinho (Serra, Peterson et al., 2008).

Outros fungos também produzem citreoviridina, como o *Penicillium charlesii*, isolado de pecan (*Carya illinoensis*) (Cole, Dorner et al., 1981), *Eupenicillium*

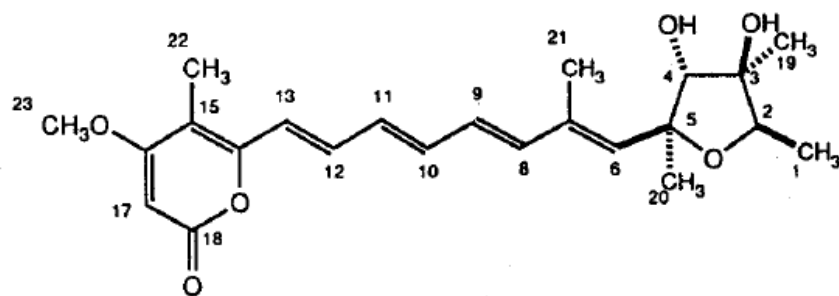
ochrasalmoneum, encontrado em milho (Wicklow e Cole, 1984), ambos nos Estados Unidos, *Penicillium pulvillorum*, isolado também de milho na África do Sul (Nagel, Scott et al., 1972), além de *Penicillium manginii* e *Penicillium miczynskii* (Christensen, Frisvad et al., 1999).

3.2 Características Físico-químicas da Citreoviridina

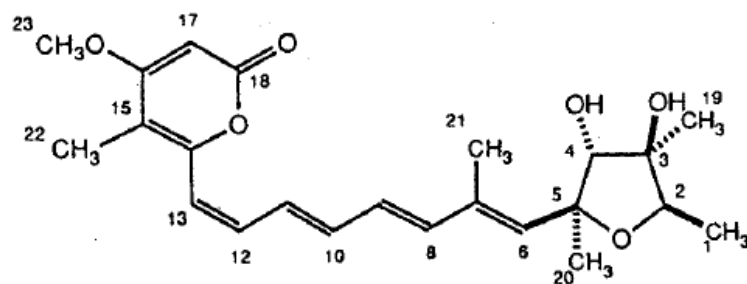
Quando cristalizada a partir de metanol, a citreoviridina forma cristais amarelos com ponto de fusão entre 107 e 111°C, tendo como fórmula molecular $C_{23}H_{30}O_6$ (MM = 402,2). É solúvel em benzeno, etanol, acetona, clorofórmio, e insolúvel em hexano e água. A estrutura química da citreoviridina (Figura 6a) consiste de uma lactona separada por uma cadeia poliênica de um anel tetrahydrofurano e foi elucidada em 1964 por pesquisadores japoneses através de método de degradação química e espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Sakabe, Goto et al., 1964; Ueno, 1970).

Citreoviridina é sensível à luz, sofrendo foto-isomerização. Nagel et al. (1972) foram os primeiros a relatar a formação de uma mistura isomérica ao expor solução de citreoviridina à luz difusa e chamaram o isômero formado de isocitreoviridina (Figura 6b). Suh e Wilcox (1988) estudaram o efeito de três fontes de luz sobre uma solução de citreoviridina e foi observado que ao final do tempo de exposição houve conversão de cerca de 40% de citreoviridina em isocitreoviridina (Figura 7).

A isocitreoviridina difere da citreoviridina pela ligação dupla entre os carbonos C12 e C13, que é *Z* na isocitreoviridina e *E* na citreoviridina (Suh, Huh et al., 1996). Seus espectros no infravermelho (IV) e de espectrometria de massas (EM) são praticamente iguais. A principal diferença espectrométrica entre as duas moléculas é encontrada no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (H^1 -RMN) na região entre 6,30 e 6,54 ppm (Suh, Huh et al., 1996).



CITREOVIRIDIN



ISOCITREOVIRIDIN

Figura 6 - Estruturas químicas da (a) citreoviridina e da (b) isocitreoviridina (Suh, Huh et al., 1996).

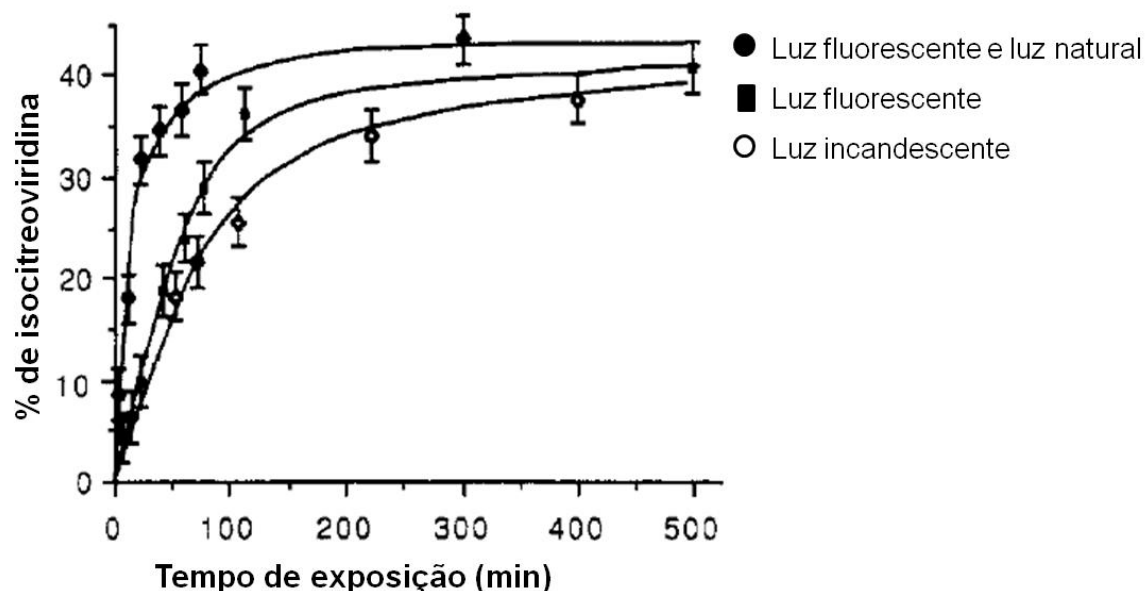


Figura 7 – Efeito de três fontes de luz em uma solução de citreoviridina: luz fluorescente e luz natural; somente luz fluorescente; luz incandescente de 90 W (Suh e Wilcox, 1988).

A presença de isocitreoviridina em amostras de alimentos e em padrões de citreoviridina foi relatada por diversos pesquisadores. A taxa de conversão entre os isômeros (citreoviridina : isocitreoviridina) encontrada variou entre os trabalhos.

Stubblefield et al. (1988) encontraram uma taxa de 85:15 após análise de padrão de citreoviridina por detector de fluorescência e 7:3 analisando por detector de ultravioleta. Suh, Huh et al. (1996), Sayood et al. (1989), Rosa, Keller et al. (2010) encontraram em padrão analítico de citreoviridina taxas de 3:2, 7:4, 6:4, respectivamente.

3.3 Produção de Citreoviridina

Métodos para produção de citreoviridina em meio de cultura ou outros substratos foram estabelecidos por diversos autores, na maioria das vezes com intuito de conduzir estudos toxicológicos ou estudar suas características físico-químicas.

Em grande parte dos estudos de produção de citreoviridina, o fungo produtor da toxina era cultivado em meio de cultura ou arroz como substrato. Os solventes mais utilizados para extração foram clorofórmio e etanol. Colunas de sílica-gel foram empregadas em praticamente todos os métodos de purificação de citreoviridina. O Quadro 3 apresenta um resumo dos métodos desenvolvidos para a produção de citreoviridina. A maioria dos estudos foi publicada há mais de 20 anos.

Quadro 3 – Métodos de produção de citreoviridina.

Referência	Objetivo	Resumo da metodologia
Sakabe, Goto et al., 1964; Sakabe, Goto et al., 1977	Elucidar a estrutura química da citreoviridina	<i>P. citreoviride</i> foi cultivado em arroz lavado (400 mL) em erlenmeyer (1 L) a 20-24°C por 30-40 dias. Extraído com acetona e evaporado a vácuo até precipitação. Precipitado dissolvido em acetona e reprecipitado pela adição de éter de petróleo e então dissolvido em benzeno. Purificação: coluna em alumina lavada com ácido e eluída com metanol-éter (1:10).
Ueno, 1970	Testes toxicológicos e análises físico-químicas	a) <i>P. citreoviride</i> foi cultivado em arroz (200 g) em placas de petri a 20-24°C por 3 semanas. Seco a 52-53°C por 2 dias. Extraído com etanol, concentrado a vácuo. Purificado em coluna de sílica gel e eluída com hexano acetona (2:1). b) <i>P. citreoviride</i> cultivado como descrito acima (a). Extraído éter. Purificação da fase do éter em coluna de Kieselgel e eluída com hexano acetona (2:1). c) <i>P. citreoviride</i> foi cultivado em 200 mL de meio de cultura a 20°C por 3 semanas. Avaliou 5 diferentes tipos de meio de cultura. O micélio foi seco a 50°C por 2 dias e extraído e purificado como no procedimento (a).
Nagel, Steyn et al., 1972	Biossíntese	<i>P. pulvillorum</i> foi cultivado em 100 mL de meio Ushinsky em erlenmeyers (0,5 L), a 25°C por 13 a 20 dias. O meio foi extraído com clorofórmio e o micélio com clorofórmio:metanol(1:1). O extrato foi particionado entre 90% Metanol e hexano e concentrado. Para purificação a camada do metanol foi separada em coluna de celulose, impregnada em formamida, e eluída com mistura de hexano e benzeno.
Datta e Ghosh, 1981	Testes toxicológicos	<i>P. citreoviride</i> foi cultivado em 250 mL de meio cultura em frascos cônicos (0,5 L), a 20-24°C por 21 dias. Avaliou 5 diferentes tipos de meio de cultura. Extraído com clorofórmio e secos a 60-65°C <i>overnight</i> . Purificação em coluna de sílica gel, eluída com hexano-acetona (2:1)
Cole, Dorner et al., 1981	Testes toxicológicos	<i>P. charlessi</i> foi cultivado em 100 g de trigo e 200 mL de meio de cultura em erlenmeyers a 25-27°C por 14 dias. Extraído com clorofórmio e concentrado a vácuo a 60°C. Purificação em coluna de sílica gel, eluída com benzeno, éter etílico, acetato de etila e acetona.
Hong, Huang et al., 2010	Testes toxicológicos	<i>P. citreonigrum</i> foi cultivado em milho por 3 semanas. Extração com etanol, benzeno e hexano. Purificação em coluna de sílica gel, eluída com hexano-acetona (1:1).

3.4 Ocorrência de Citreoviridina em Alimentos

Há poucos dados de contaminação de alimentos por citreoviridina. A toxina foi isolada do arroz mofado no evento da doença do arroz amarelo no Japão, mas seus níveis não foram quantificados.

No sudoeste da Georgia, EUA, fragmentos de pecã continham cerca de 170 mg/kg citreoviridina (Cole, Dorner et al., 1981). Citreoviridina foi detectada em amostras de milho no sul da Geórgia em níveis de 19 a 2.790 µg/kg, que também continha aflatoxinas B₁ e B₂, em níveis de 7 a 360 µg/kg (Wicklow, Stubblefield et al., 1988). Na Coréia do Sul, Chung et al. (1999) encontraram citreoviridina em grãos (soja, trigo e milho) em níveis de 40 a 80 mg/kg, além de brefeldina A, griseofulvina, citrinina, patulina e ocratoxina A. Na Bélgica, 14 amostras de poeira de grãos (principalmente de trigo e cevada) foram coletadas de fazendas e empresas de armazenagem e analisadas para 15 micotoxinas. Citreoviridina foi encontrada em 11 amostras em concentração média de 0,1 e máxima de 0,7 mg/kg, além de ácido penicílico, gliotoxina e deoxivalenol, com valores médios de 6,9, 6,5 e 5,5 mg/kg, respectivamente (Tangni e Pussemier, 2007).

Em Burkina Faso e Moçambique, 122 amostras de diversas matrizes foram analisadas e citreoviridina foi encontrada em milho e ração. Um amostra de milho continha 19 micotoxinas, dentre as com maior concentração estavam fumonisina B₁, aflatoxina B₁ e citreoviridina com 1167, 636 e 554 µg/kg, respectivamente (Warth, Parich et al., 2012).

A suspeita da relação do surto de beribéri no estado do Maranhão com o consumo de arroz contaminado por citreoviridina foi levantada e 420 amostras de arroz foram coletadas de 35 diferentes regiões do Maranhão. Destas amostras, 5 apresentaram contaminação por citreoviridina em níveis de 12 a 254 µg/kg (Rosa, Keller et al., 2010). Em outro trabalho, 230 amostras de arroz, seus sub-produtos e derivados foram coletadas de diferentes regiões do Brasil, destas 126 foram analisadas para citreoviridina, sendo 28 positivas em níveis de 0,9 a 51,0 µg/kg. A coocorrência de citreoviridina e zearalenona, aflatoxinas e ocratoxina A foi observada em 23, 27 e 20 amostras, respectivamente (Almeida, Almeida et al., 2012).

Vários autores desenvolveram métodos analíticos para análise de citreoviridina em alimentos contaminados artificialmente (Quadro 4), mas nestes estudos, amostras contaminadas naturalmente não foram analisadas.

Quadro 4 - Principais características dos métodos analíticos para citreoviridina.

Referência	Matriz/Extração	Análise	Limites
Ueno, 1970	Arroz e fungo ^a (<i>P.citreoviride</i>).	CCD em sílica-gel. UV a 388 nm.	LOQ: µg
Cole, Dorner et al., 1981	Fragmentos de peça ^b /clorofórmio e <i>clean-up</i> SPE	Espectrofotômetro a 390 e 802 nm	não informados
Wicklow e Cole, 1984	<i>Eupenicillium ochrosalmoneum</i> ^a	HPLC/UV (388 nm).	LOD: 3-5 ng
Stubblefield , Greer et al., 1988	Milho e arroz ^a / diclorometano, <i>clean-up</i> em SPE	HPLC/FL: 388/480 nm	LOD: 2 ng/g
Liu, Li et al., 2007	Grãos ^b /acetonitril a:água (80:20)	CCD em sílica-gel. UV a 366 nm	LOD: 25 ng
Tangni e Pussemier, 2007	Poeira de grãos ^b / acetonitrila:água (90:10) ; <i>clean-up</i> em SPE	HPLC/DAD: 220, 270 e 332 nm	LOD: 0,01 µg/g LOQ: 0,03 µg/g
Rosa, Keller et al., 2010	Arroz ^b /dicloromet ano e <i>clean-up</i> em SPE	HPLC/FL 388/480 nm	LOD: 1 ng/g
Almeida, Almeida et al., 2012	Arroz e derivados ^b /dicloro metano, <i>clean-up</i> em SPE	HPLC/UV (385 nm).	LOD: 0,9 µg/kg LOQ: 1,8 µg/kg
Warth, Parich et al., 2012	Grãos, amendoim, ração ^b /acetonitril a, água e ácido acético (79:20:1)	LC-MS/MS	LOD: 25 µg/kg

^a amostras artificialmente contaminadas; ^b amostras naturalmente contaminadas.

SPE: extração em fase sólida; CCD: cromatografia em camada delgada; HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; DAD: detector de arranjo de diodos; FL:detector de fluorescência; UV: detector ultravioleta; LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; LOD: limite de detecção, LOQ: limite de quantificação.

3.5 Toxicologia da Citreoviridina

Os primeiros estudos sobre a toxicidade da citreoviridina começaram a ser realizados na década de 40, durante investigações da associação do consumo de arroz contaminado por *P. citreoviride* com beribéri cardíaco agudo. Myake et al. (1940) avaliaram a toxicidade do extrato de arroz contendo *P. citreoviride* e observaram em vários animais os mesmos efeitos neurotóxicos observados no beribéri cardíaco agudo. A partir daí muitos estudos foram realizados tentando confirmar a associação desta doença com o consumo do arroz contaminado.

Uraguchi (1969) avaliou os efeitos tóxicos do extrato etanólico do arroz em 14 diferentes vertebrados, desde peixes até macacos. A dose letal subcutânea foi semelhante para os mamíferos e outros vertebrados (0,5 g/kg). Com uma injeção parenteral, os animais morreram em um dia, com paralisia progressiva ascendente, diminuição gradual da temperatura do corpo, sinais de convulsão, variação nos reflexos, danos cardiovasculares e falência respiratória. Os sintomas no sistema nervoso apareceram mais marcadamente nos mamíferos superiores como cães, gatos e macacos do que em répteis, anfíbios e peixes. Também foram observados dilatações no lado direito do coração e paralisia dos movimentos do diafragma. A citreoviridina distribui-se facilmente pelo sistema nervoso central, fígado, rins, córtex adrenal e tecido adiposo, e foi encontrada no leite, urina, bile e vômito. Nos casos em que o animal sobrevivia aos testes, a recuperação era rápida e a maioria dos sintomas desaparecia logo, exceto em alguns casos, que sintomas como paralisia residual e cegueira persistiram durante um longo período.

Ueno (1970) desenvolveu uma metodologia para purificação de citreoviridina, avaliando a toxicidade das diferentes frações obtidas no processo de purificação e comparando ao extrato bruto (sem purificação). Enquanto a dose letal 100% (DL₁₀₀) intraperitoneal para camundongos do extrato bruto foi de 5,0 mg/10 g, para as frações obtidas pela purificação do extrato, a DL₁₀₀ foi pelo menos 10 vezes menor (0,2-0,5 mg/10 g), mostrando que a toxina pura tem um potencial tóxico muito maior que o extrato bruto. A administração subcutânea da toxina purificada levou a DL₁₀₀ de 0,5-1,0 mg/10 g, duas vezes maior que a intraperitoneal. Os sintomas observados foram, inicialmente, paralisia das pernas traseiras e rabo, evoluindo para as pernas dianteiras e pescoço, sendo a morte por parada respiratória. Os mesmos sintomas

foram relatados para o extrato bruto e toxina purificada, sendo muito semelhantes aos observados por Uraguchi (1969).

Ueno e Ueno (1972) determinaram a dose letal (DL_{50}) de citreoviridina para camundongos machos por administração intraperitoneal (7,2 mg/kg), subcutânea (11 mg/kg) e oral (29 mg/kg) e para ratas fêmeas a DL_{50} subcutânea foi de 3,5 mg/kg. Foi observado que a citreoviridina é absorvida rapidamente por administração subcutânea e sua excreção se dá principalmente pelas fezes. Cole, Dorner et al. (1981) determinaram a DL_{50} oral para galinhas de 37,5 mg/kg.

Já está claro pela literatura que a citreoviridina atua principalmente por inibição das enzimas adenosina trifosfatase (ATPase) (Beechey, Osselton et al., 1974; Linnett, Mitchell et al., 1978; Satre, Bof et al., 1980; Gause, Buck et al., 1981; Sayood, Suh et al., 1989). Sayood, Suh e colaboradores (1989) avaliaram o efeito da citreoviridina e da isocitreoviridina (seu isômero) sobre as ATPases e observaram que enquanto a citreoviridina é um potente inibidor dessas enzimas, a isocitreoviridina não teve nenhum efeito sobre elas. Segundo este estudo a fotoisomerização da ligação dupla da citreoviridina resultou em total perda da atividade inibitória confirmando que a citreoviridina é um inibidor potente e estereoespecífico das ATPases. Os autores ressaltam com isso, que essa isomerização da citreoviridina pode ser uma importante fonte na variabilidade dos resultados observados nos testes toxicológicos (Sayood, Suh et al., 1989).

A citreoviridina parece inibir as transcetolases, enzimas envolvidas no metabolismo das pentoses-fosfato que necessitam de tiamina pirofosfato (TPP) para algumas de suas reações. A TPP é uma coenzima derivada da tiamina (vitamina B₁). Quando há deficiência de tiamina, diminui os níveis de TPP e consequentemente a atividade da enzima transcetolase. A diminuição da atividade da transcetolase retarda toda a via das pentoses-fosfato e pode resultar em beribéri Wernicke-Korsakoff (Nelson e Cox, 2004). Datta e Ghosh (1981) avaliaram a inibição da enzima transcetolase *in vivo* por administração subcutânea de citreoviridina em ratos durante 10 dias e *in vitro*. A atividade da transcetolase foi inibida significativamente pela citreoviridina de maneira dose-dependente tanto *in vivo* quanto *in vitro*, demonstrando atividade antitiamina da citreoviridina.

Datta e Ghosh (1982) mostraram uma diminuição significativa no conteúdo de glicogênio, proteínas e RNA em cérebro e fígado de ratos após administração de citreoviridina em doses de 4 ou 6 mg/kg durante 10 dias consecutivos. Datta e

Ghosh (1983) sugeriram que a neurotoxicidade da citreoviridina poderia estar relacionada ao metabolismo do ácido gama-aminobutírico (GABA) no sistema nervoso central, já que o tratamento com citreoviridina mostrou reduzir os níveis de GABA de maneira dose-dependente.

Citreoviridina causou toxicidade materna, perda pós-implantação, retardo esquelético e defeitos no desenvolvimento dos filhotes de ratas tratadas por intubação gástrica (Morrissey e Vesonder, 1986). Nenhum efeito foi observado na implantação do ovo e na reabsorção embrional após administração subcutaneamente única de citreoviridina em ratas nos 4º e 5º dia de gravidez, (Nishie, Cole et al., 1988).

Estudos para investigar uma possível associação da doença de Keshan com o consumo de cereais contaminados por citreoviridina mostraram que em células do miocárdio de ratos tratadas com citreoviridina foram observados danos no DNA na maior dosagem (13 $\mu\text{mol/L}$) (Liu, Jiang et al., 2006). Células endoteliais da veia umbilical isoladas do cordão umbilical humano, tratadas com citreoviridina tiveram menor viabilidade, maiores taxas de apoptose e maiores níveis de danos ao DNA do que o controle (Hou, Li et al., 2011). Ratos alimentados por ração contaminada com 15 mg/kg/dia citreoviridina durante 8 semanas apresentaram degeneração e necrose nos miócitos cardíacos (*in vitro*) e no miocárdio de ratos (Liu, Wang et al., 2007; Hong, Huang et al., 2010).

4 ESPECTROSCOPIA MOLECULAR

Espectroscopia é um termo amplo, que abrange muitas técnicas que se utilizam de radiação eletromagnética para levantamento de dados físico-químicos com diversos fins, incluindo confirmação da identidade e elucidação de estruturas químicas de moléculas desconhecidas. No espectro eletromagnético (Figura 8) as principais regiões utilizadas para se obter informações fundamentais sobre as estruturas de moléculas orgânicas são: ultravioleta/visível (UV/Vis), infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) (Pavia, Lampman et al, 2012).

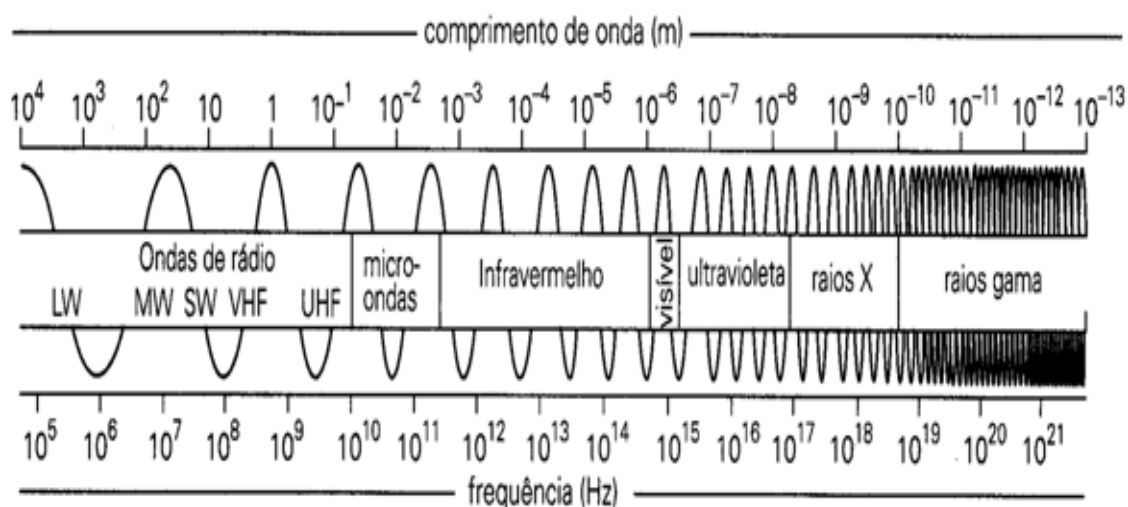


Figura 8 – Espectro eletromagnético (Portugal, 2007).

4.1 Espectrometria no Ultravioleta/Visível

A região do espectro eletromagnético correspondente ao UV/Vis compreende os comprimentos de onda de 190 a 800 nm (Figura 8). A absorção de radiação nesta região é resultado de transições que ocorrem entre níveis de energia eletrônicos. Quando uma radiação atravessa um material transparente, parte dela é absorvida e quando a molécula absorve energia, um elétron é promovido de um orbital para outro de maior energia potencial. A Figura 9 ilustra as possíveis transições entre os diferentes níveis de energia, que ocorrem dos orbitais ocupados σ e π e não ligante n (menor energia) para os orbitais desocupados ou antiligantes σ^* e π^* (maior energia) (Pavia, Lampman et al, 2012).

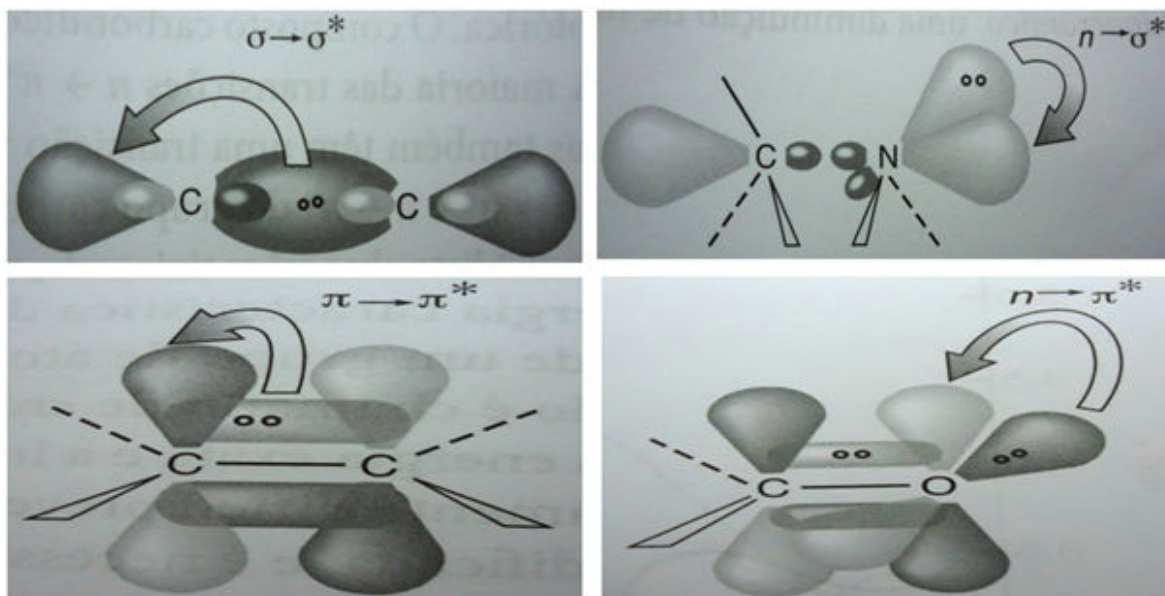
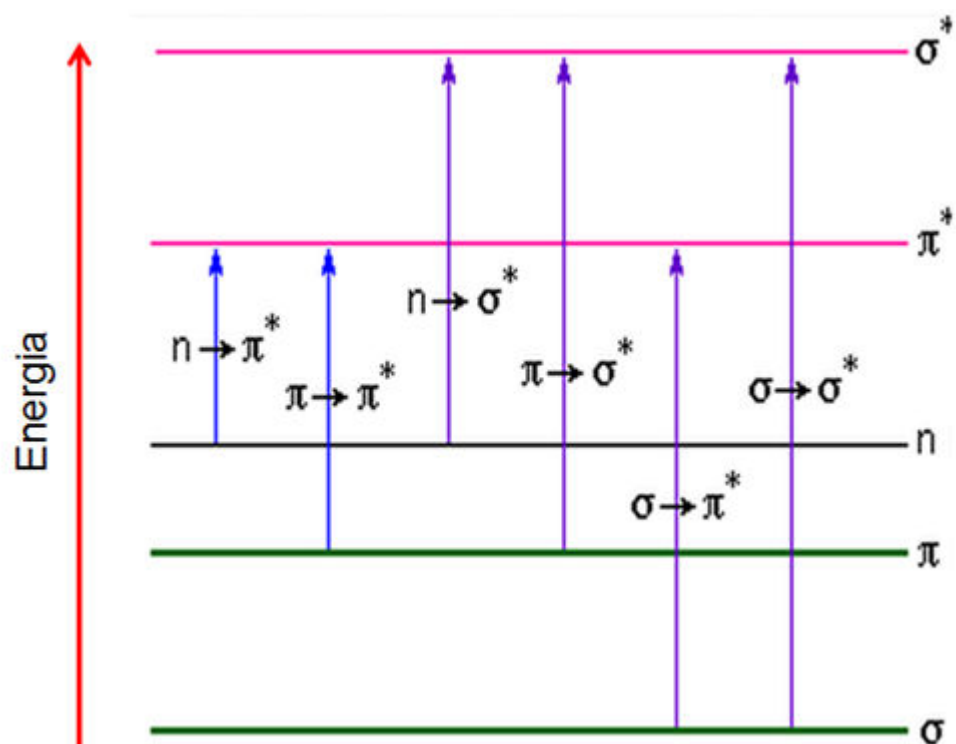


Figura 9 – Transições entre os níveis de energia eletrônicos (Pavia, Lampman et al, 2012).

A intensidade da absorção depende do comprimento de onda da radiação e da estrutura do composto. Os cromóforos simples, como $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$ e NO_2 , absorvem aproximadamente no mesmo comprimento de onda, de 160 a 210 nm (Quadro 5) (Pavia, Lampman et al, 2012). Auxocromo são grupos saturados contendo elétrons não compartilhados que quando se ligam aos cromóforos mudam

tanto a intensidade quanto o comprimento de onda da absorção, por exemplo, OH, NH₂, Cl. Cromóforos combinados ou extensão da conjugação também podem afetar significativamente a posição e intensidade das bandas de absorção (Figura 10) (Kalsi, 2004).

Quadro 5 – Absorções típicas de cromóforos isolados simples (Pavia, Lampman et al, 2012).

Classe	Transição	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\log \epsilon$
R – OH	$n \rightarrow \sigma^*$	180	2,5
R – O – R	$n \rightarrow \sigma^*$	180	3,5
R – NH ₂	$n \rightarrow \sigma^*$	190	3,5
R – SH	$n \rightarrow \sigma^*$	210	3,0
R ₂ C = CR ₂	$\pi \rightarrow \pi^*$	175	3,0
R – C $\equiv$ C – R	$\pi \rightarrow \pi^*$	170	3,0
R – C $\equiv$ N	$n \rightarrow \pi^*$	160	<1,0
R – N = N – R	$n \rightarrow \pi^*$	340	<1,0
R – NO ₂	$n \rightarrow \pi^*$	271	<1,0
R – CHO	$\pi \rightarrow \pi^*$	190	2,0
	$n \rightarrow \pi^*$	290	1,0
R ₂ CO	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	3,0
	$n \rightarrow \pi^*$	280	1,5
RCOOH	$n \rightarrow \pi^*$	205	1,5
RCOOR'	$n \rightarrow \pi^*$	205	1,5
RCNH ₂	$n \rightarrow \pi^*$	210	1,5

λ = comprimento de onda; ϵ = absorvidade molar.

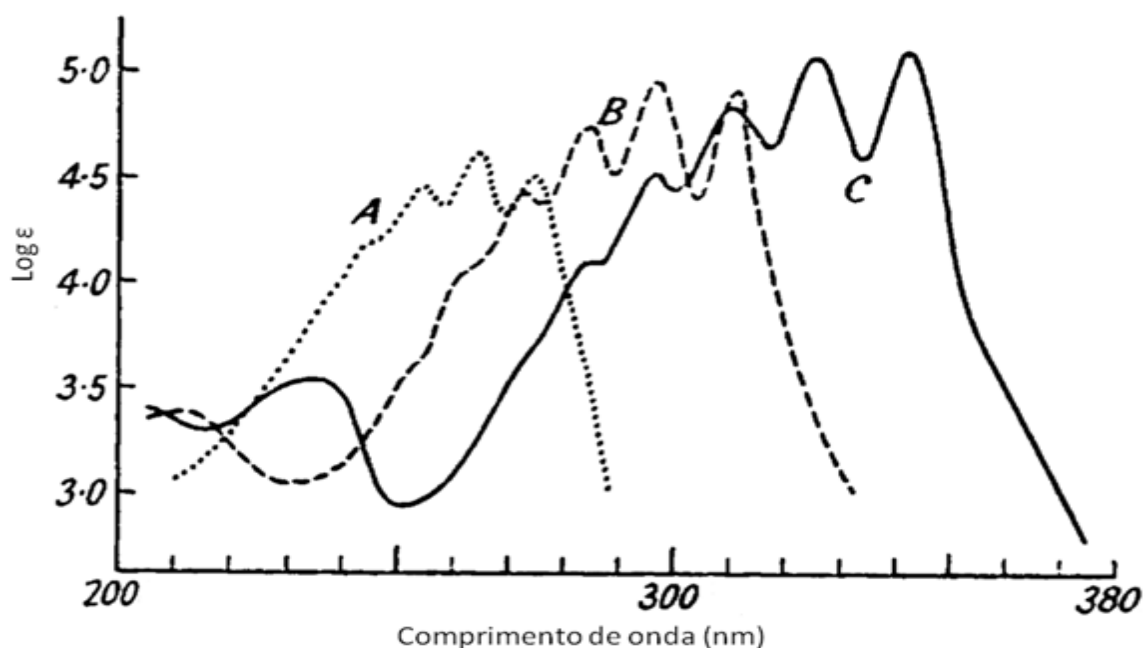


Figura 10 – Efeito da conjugação na posição e intensidade de absorção em um espectro de UV/Vis (Nayler e Whiting, 1955). $\text{CH}_3-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{CH}_3$ onde: (A) $n = 3$, (B) $n = 4$ e (C) $n = 5$.

Os auxocromos ao se ligarem aos cromóforos podem provocar diferentes efeitos, como o deslocamento para o vermelho ou batocrômico, que ocorre geralmente quando há ligação com elétrons π , deslocando a absorção máxima para comprimentos de onda mais longos (energia mais baixa), e o efeito hiperacrômico, quando há aumento da intensidade de absorção, por exemplo, por um aumento na conjugação (Kalsi, 2004).

O espectro de UV/Vis é geralmente registrado como uma função do comprimento de onda e da absorbância ou da absorvidade molar (coeficiente de extinção) que é definida pela Lei de Beer-Lambert (Eq. 1):

$$\log(I_0/I) = \epsilon l c \text{ ou } \epsilon = A/cl \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: I_0 = intensidade da luz incidindo na amostra; I = luz transmitida após atravessar solução da amostra; $\log(I_0/I)$ = absorbância (A) da solução; c = concentração molar do soluto; l = comprimento da cela da amostra (cm); ϵ = absorvidade molar.

4.2 Espectrometria no Infravermelho

A radiação infravermelho (IV) corresponde à região do espectro eletromagnético entre as regiões do visível e das microondas (Figura 8). A região do IV pode ser dividida em infravermelho próximo (14000 a 4000 cm^{-1}), médio (4000 a 400 cm^{-1}) e distante (400 a 10 cm^{-1}), onde a região do IV médio é a de maior interesse para estudo de estruturas de compostos orgânicos (Silverstein, Webster et al., 2010; Larkin, 2011).

A absorção da energia radiante na região do IV não é suficiente para excitação a nível eletrônico, mas pode induzir excitação a nível vibracional de átomos ou grupos ligados covalentemente. Somente as vibrações que alteram o momento dipolo da molécula são observadas na região do IV médio (Silverstein, Webster et al., 2010).

O movimento molecular que resulta das características vibracionais das moléculas é descrito pelo seu grau de liberdade. O grau de liberdade de uma molécula é igual a $3n$, considerando n o número de átomos e cada átomo possui 3 graus de liberdade (X, Y e Z). Nas moléculas não-lineares, três graus de liberdade são de translação e três de rotação, já nas lineares somente dois são de rotação, restando $3n - 6$ e $3n - 5$ graus de liberdade vibracionais nestas moléculas, respectivamente. Os diferentes modos vibracionais são apresentados na Figura 11. A molécula de água, como não-linear, possui 3 modos vibracionais $[(3 \times 3) - 6]$ (Figura 12a). A molécula de CO_2 , linear, possui 4 modos vibracionais $[(3 \times 3) - 5]$ (Figura 12b) (Larkin, 2011).

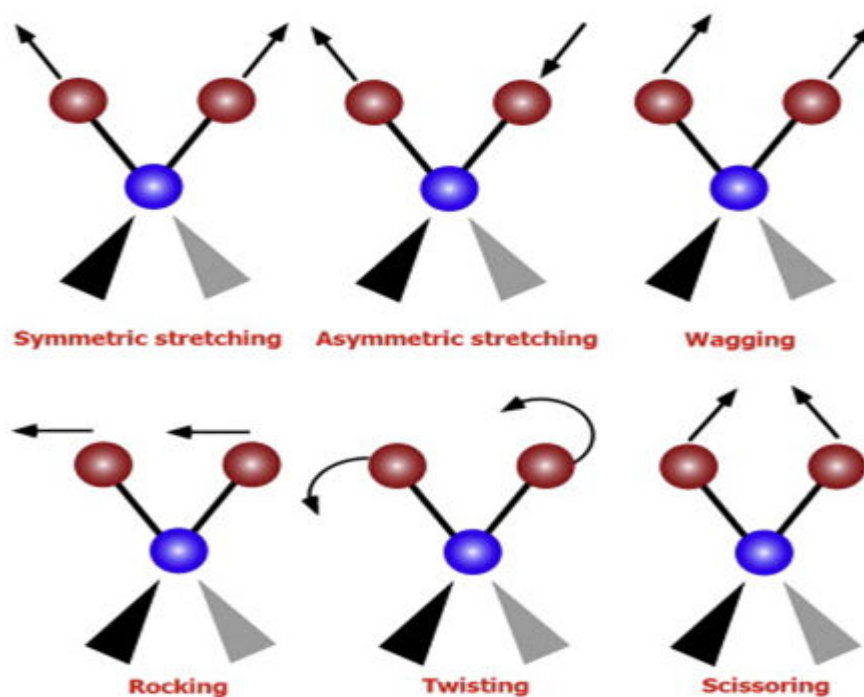


Figura 11 – Modos vibracionais associados a mudanças do momento dipolo detectáveis no Infravermelho (Marcelli, Cricenti et al., 2012).

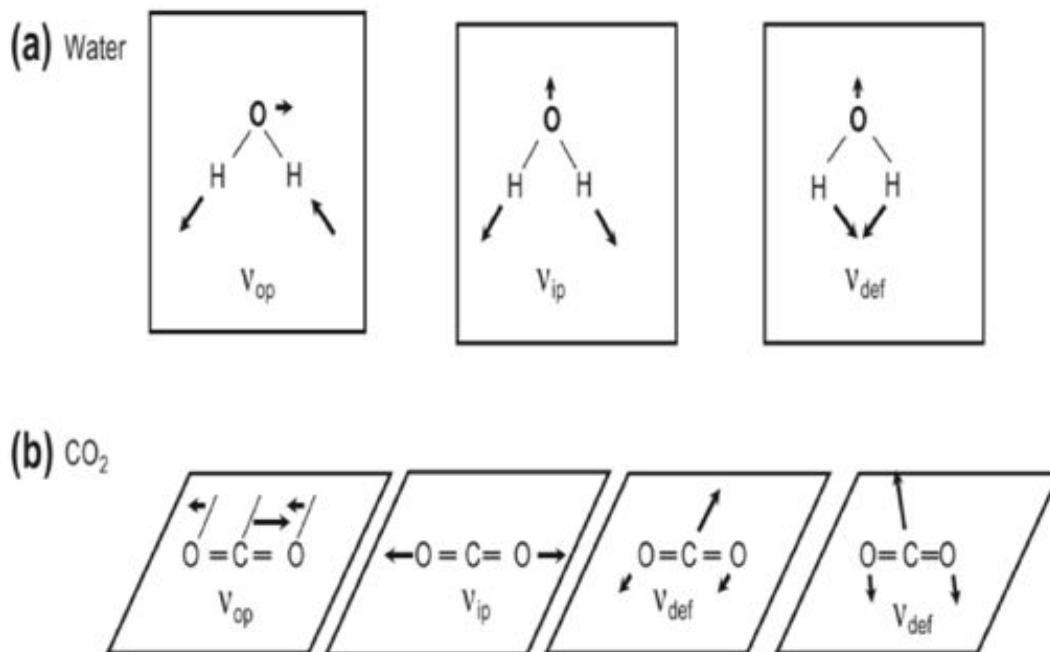


Figura 12 – Modos vibracionais de H_2O (a) e CO_2 (b) (Larkin, 2011).

Cada tipo de ligação tem sua própria frequência de vibração, e em diferentes compostos vão resultar em diferentes perfis de absorção. A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos (Silverstein, Webster et al., 2010). A região onde cada frequência de vibração ocorre pode ser estimada pela aplicação da lei de Hooke (Eq. 2):

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{f(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}}$$

Eq. 2

Onde: $\bar{\nu}$ = frequência vibracional (cm^{-1}), número de ondas; c = velocidade da luz (cm/s); f = constante de força da ligação (dyn/cm); m_1 = massa do átomo 1 (g); m_2 = massa do átomo 2 (g).

Assim, quanto menor a massa dos átomos e maior a força de ligação entre eles, maior será a frequência de absorção (Kalsi, 2004). A Figura 13 apresenta as frequências características dos grupos funcionais mais comuns.

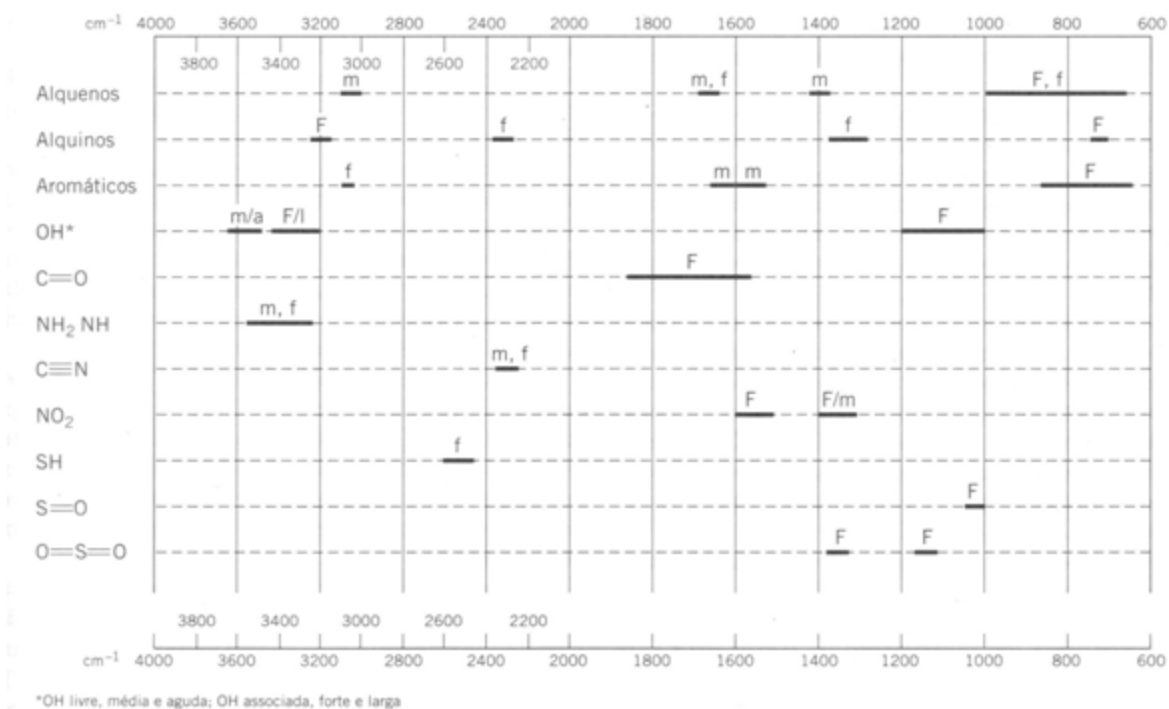


Figura 13 – Frequências características dos grupos funcionais mais comuns em espectro IV. F = forte, m = médio, f = fraco, a = agudo, l = largo. (Silverstein, Webster et al., 2010).

O espectro de IV é, geralmente, apresentado em função do comprimento de onda (λ) ou número de ondas ($\bar{\nu}$) *versus* intensidade de absorção expressa em transmitância ou absorbância. A intensidade de absorção no espectro de IV raramente é descrita quantitativamente, normalmente se utilizam termos semi-quantitativos como forte (F), fraco (f), médio (m) (Yadav, 2005; Silverstein, Webster et al., 2010).

O espectro de IV corresponde a uma “impressão digital” da molécula, mesmo uma molécula muito simples pode dar um espectro muito complexo. Ao comparar os espectros de IV de uma amostra desconhecida ao de um composto padrão, pode-se concluir que, muito provavelmente, elas sejam idênticas quando os espectros coincidirem pico a pico (Pavia, Lampman et al, 2012).

4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN é a técnica espectrométrica com as ondas de menores frequências, normalmente na faixa de 10 a 800 MHz, correspondente aos comprimentos de onda de 30 m a 40 cm, localizada na região de radiofrequência do espectro eletromagnético (Figura 8). Certos núcleos, quando expostos a um campo magnético, ressoam em frequências características e leves variações nesta frequência fornecem informações detalhadas sobre a estrutura molecular a qual pertencem estes átomos (Jacobsen, 2007; Keeler, 2011).

Muitos átomos (por exemplo, ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P) comportam-se como se seus núcleos girassem entorno de um eixo (Figura 14), formando um pequeno campo magnético. Ao expor estes núcleos a um campo magnético externo, eles tendem a se alinhar. Como estes núcleos estão girando e possuem um momento angular, o torque exercido pelo campo externo resulta em um movimento circular chamado precessão. Quando os dois campos se alinham, a energia da radiação é transferida para o núcleo, causando uma mudança no momento angular (spin), situação chamada de ressonância (Jacobsen, 2007; Pavia, Lampman et al, 2012).

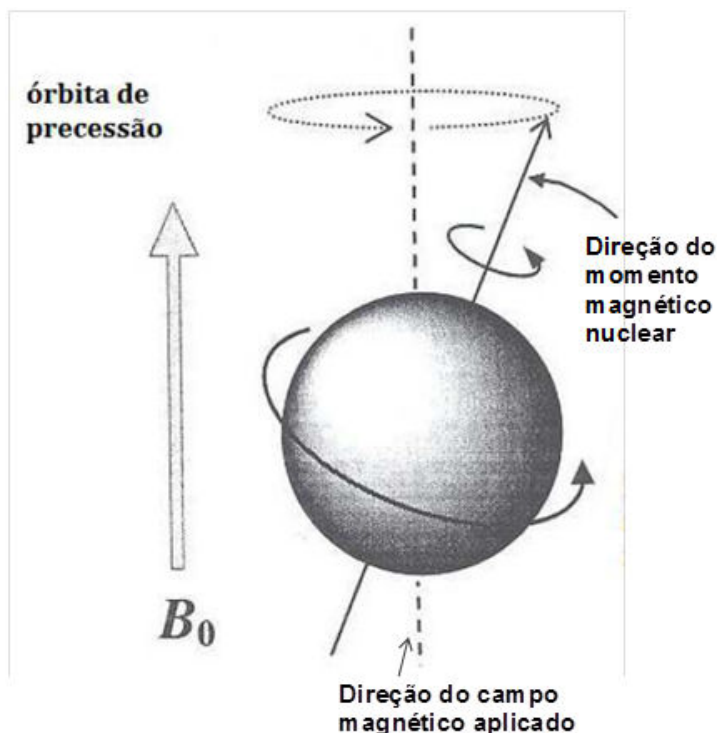


Figura 14 – Núcleo em precessão em um campo magnético de magnitude B_0 (Costa, 2010).

A taxa de precessão (ν_p , Hz) é proporcional à força do campo magnético externo (B_0) e à força magnética nuclear (γ), segundo a Eq. 3 (Jacobsen, 2007).

$$\nu_p = \gamma B_0 / 2\pi \quad \text{Eq. 3}$$

A frequência de ressonância é característica para cada tipo de núcleo, e pode variar levemente dependendo da posição em que o átomo ocupa na molécula (o ambiente químico). Isso ocorre porque as ligações eletrônicas criam pequenos campos magnéticos que modificam o campo magnético externo afetando os núcleos próximos (Jacobsen, 2007). A frequência é diretamente proporcional à força do campo magnético aplicado. Essa dependência torna difícil a comparação das frequências de absorção obtidas por espectrômetros que operaram utilizando diferentes forças de campos magnéticos. Normalmente, na espectrometria de RMN, utiliza-se o deslocamento químico (δ em ppm), que é independente do campo aplicado (MHz) e é calculado através da Eq. 4:

$$\delta = 10^6 \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad \text{Eq. 4}$$

onde, ν é a frequência (Hz) do núcleo da amostra e ν_{ref} é a frequência (Hz) obtida por um composto de referência ($\delta=0$).

Na ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, o composto de referência normalmente utilizado é o tetrametilsilano (TMS) (Keeler, 2011). Diferentes átomos de uma molécula podem ser identificados pelo deslocamento químico, baseado na simetria molecular e nos efeitos previsíveis de átomos eletronegativos ou grupos insaturados próximos (Jacobsen, 2007). Os deslocamentos químicos são afetados pela proximidade de átomos eletronegativos (O, N, Cl) e de grupos insaturados (C=C, C=O, aromáticos). Os grupos eletronegativos deslocam a absorção para esquerda (frequência mais alta), enquanto que os grupos insaturados deslocam para esquerda quando os núcleos afetados estão no plano da insaturação, e para direita quando estão acima ou abaixo deste plano. Na ausência destes grupos, o número de substituições ($\text{CH} > \text{CH}_2 > \text{CH}_3$) causa um pequeno deslocamento para esquerda. Embora a faixa de deslocamento químico seja muito maior para ^{13}C (0 a 220 ppm) do que para ^1H (0 a 13 ppm), há uma grosseira correlação entre os deslocamentos de prótons e carbonos (Figura 15) (Jacobsen, 2007).

Outra informação valiosa sobre a estrutura molecular é obtida por um fenômeno chamado acoplamento spin-spin. O núcleo magnético dos prótons pode estar alinhado tanto a favor (para cima) ou contra (para baixo) ao campo magnético externo. Considerando dois prótons com diferentes deslocamentos químicos ligados a átomos de carbono adjacentes em uma molécula orgânica, o spin de cada hidrogênio é ligeiramente afetado pelas duas orientações do outro hidrogênio, causando uma divisão no pico de ressonância (dubleto) (Figura 16). A diferença de frequência (Hz) entre os componentes do dubleto é dada pela constante de acoplamento (J) e é proporcional à força de acoplamento. Multipletos podem ser formados se existirem acoplamentos entre mais de um próton vizinho (Figura 17) (Jacobsen, 2007; Keeler, 2011; Silverstein, Webster et al., 2010).

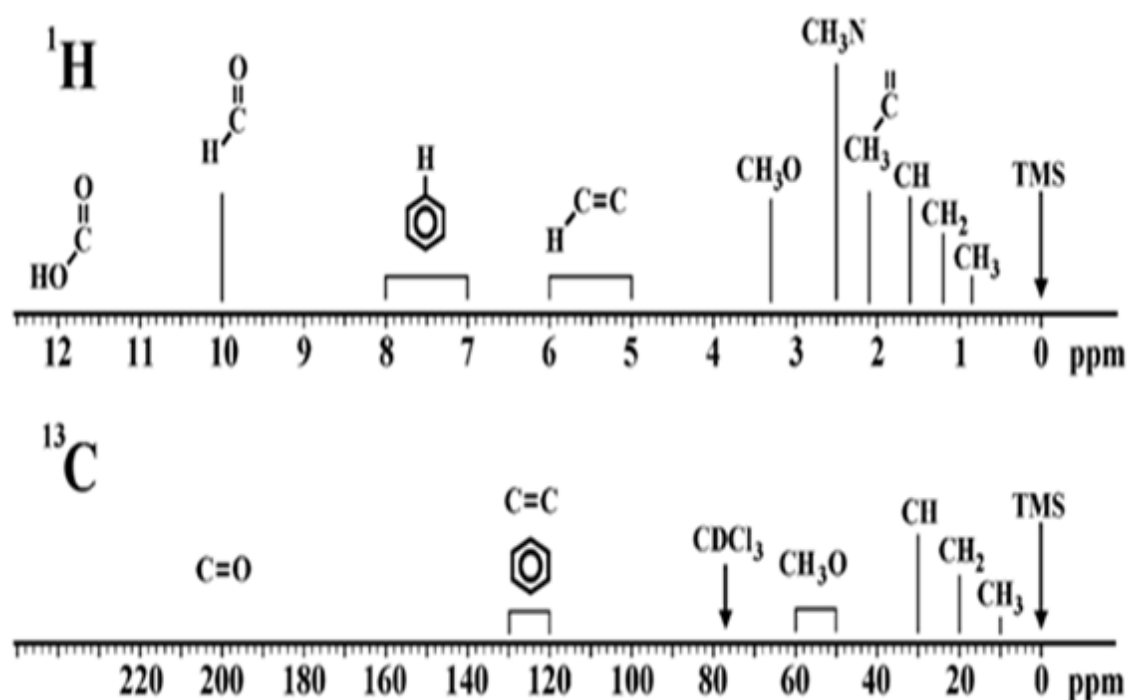


Figura 15 – Deslocamento químico dos sinais de ^1H e ^{13}C (Jacobsen, 2007).

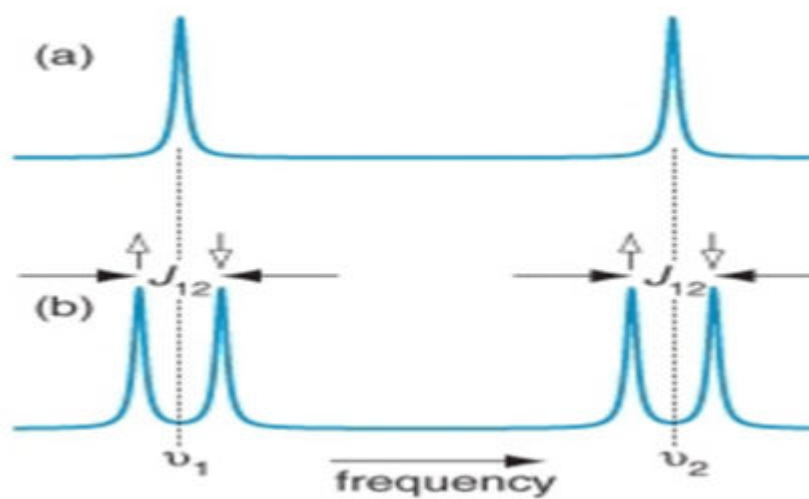


Figura 16 – Acoplamento spin-spin entre dois hidrogênios (Keeler, 2011).

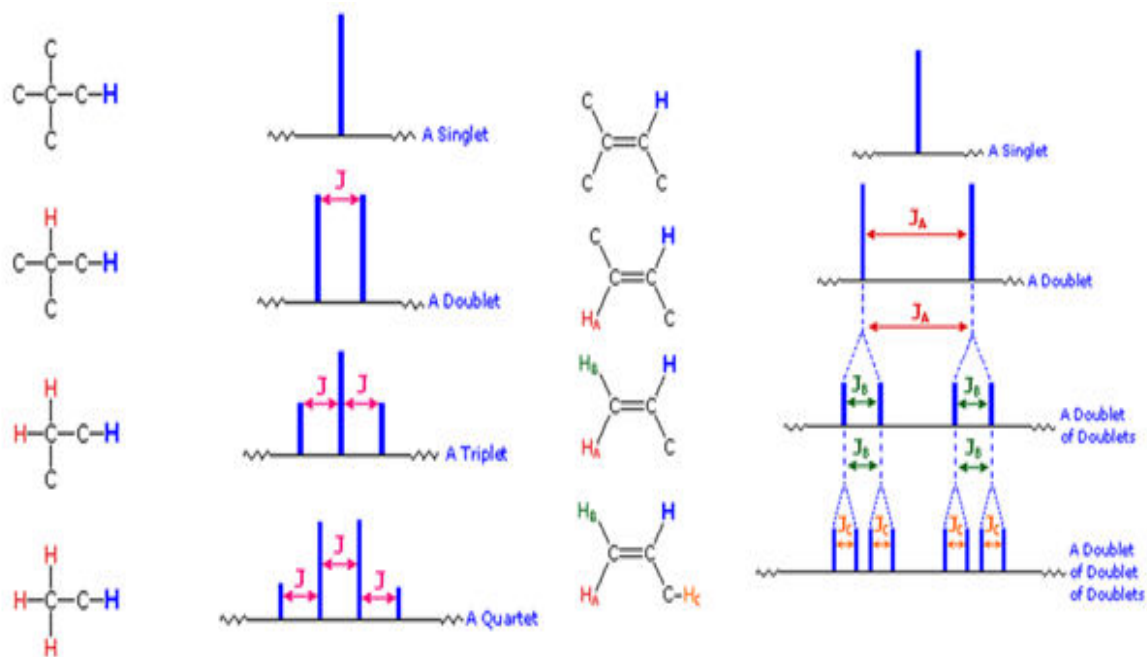


Figura 17 – Acoplamento spin-spin de hidrogênios, com constantes de acoplamento (J) semelhantes (esquerda) e diferentes (direita). (Michigan State University, 2013).

Um acoplamento entre dois núcleos do mesmo tipo é chamado de homonuclear, enquanto que quando envolve dois tipos de núcleos diferentes é chamado acoplamento heteronuclear. O núcleo ^{13}C não se acopla no espectro de ^1H -RMN devido à baixa abundância do ^{13}C (1,1%), porém ao contrário, o ^1H tem uma abundância maior que 99% e acopla efetivamente com ^{13}C . Assim os espectros de ^{13}C com acoplamento com hidrogênios, geralmente, resultam em complexa sobreposição de multipletos de difícil interpretação, por isso normalmente são realizadas técnicas de desacoplamento de hidrogênio através de irradiação de uma faixa larga de frequências, o que resulta em um espectro mais simples, onde, no geral, cada carbono gerará um único pico singlete (Silverstein, Webster et al. 2010; Pavia, Lampman et al, 2012).

Outra ferramenta importante nas técnicas de RMN são os experimentos bidimensionais ou RMN 2-D. Enquanto nas técnicas de ^1H e ^{13}C -RMN simples (unidimensionais) o sinal é apresentado em função de um só parâmetro, geralmente, deslocamento químico, no RMN 2-D se faz uma correlação entre dois eixos de frequências ou deslocamento químico. Um dos eixos representa o núcleo detectado durante a aquisição e o outro eixo pode representar o mesmo núcleo (por exemplo, ^1H - ^1H), ou um núcleo diferente (por exemplo, ^1H - ^{13}C). Na espectroscopia de

correlação COSY (*CORrelation SpectroscopY*) a faixa de deslocamento químico do espectro de prótons é registrada em ambos os eixos. Na Correlação Heteronuclear Múltiplo-Quântica (HMQC – *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) e na Coerência Heteronuclear através de Muitas Ligações (HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) a faixa de deslocamento químico do espectro do próton é registrada em um eixo, e no segundo eixo a faixa de deslocamento químico de ^{13}C da mesma amostra. A diferença entre eles é que enquanto no HMQC se observa as correlações entre ^1H e ^{13}C para os núcleos de carbono com uma ligação direta a um ou mais núcleos de hidrogênio, no HMBC são observados os acoplamentos a longa distância, para os núcleos de carbono com mais de duas ligações com os núcleos de hidrogênio, nele se obtém indiretamente, por exemplo, as correlações carbono-carbono (embora não as correlações ^{13}C – ^{13}C) e as correlações entre carbonos tetrassubstituídos e hidrogênios próximos (Silverstein, Webster et al. 2010; Pavia, Lampman et al, 2012).

4.4 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (MS – *Mass Spectrometry*) é outra técnica importante para se obter informações a fim de caracterizar estruturas químicas. Através da espectrometria de massas, pode-se determinar com precisão as massas dos compostos e átomos pela conversão dos compostos em íons.

De maneira geral, a espectrometria de massas envolve três etapas (Figura 18). Primeiramente, as moléculas do analito ou átomos são convertidas em espécies iônicas através de um método de ionização, pela remoção ou a adição de um elétron ou de prótons. No processo de ionização, o excesso de energia transferida para molécula, pode “quebrá-la” em fragmentos característicos. Posteriormente em um analisador de massas, os íons moleculares e seus fragmentos carregados são separados e analisados baseados em sua razão massa/carga (m/z). E por fim, atingem o detector que registrará o número de íons de cada unidade de massa/carga, gerando um espectro. O analisador de massas é mantido sob alto vácuo para que os íons movam-se livremente sem colidir ou interagir com outras espécies, evitando a fragmentação do íon molecular e a formação de espécies diferentes por reações íon-molécula (Dass, 2007).

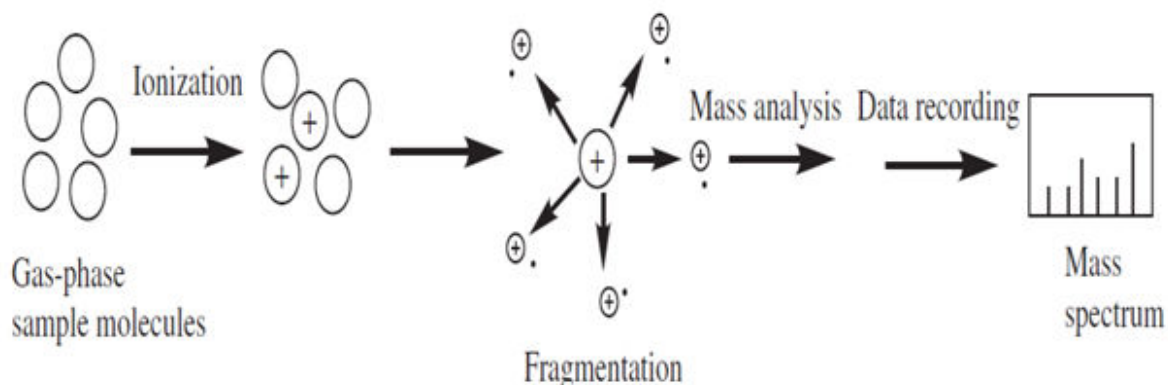


Figura 18 – Aspecto geral da espectrometria de massas (Dass, 2007).

Existem vários métodos de ionização, incluindo a ionização por eletrospray (ESI), esquematizada na Figura 19. Na ESI, a molécula é ionizada em pressão quase atmosférica. A amostra em solução entra na fonte de ionização por um tubo capilar de aço que tem um potencial de alta voltagem em sua superfície. Quando a solução deixa o tubo capilar, forma-se um aerossol de gotículas carregadas, que enfrentam um contrafluxo de um gás de secagem (geralmente nitrogênio) que evapora o solvente, concentrando os íons carregados da amostra. Quando a repulsão eletrostática dos íons chega a um ponto crítico, a gotícula sofre a chamada “explosão coulômbica” que libera os íons para a fase de vapor que entrará no analisador de massas (Silverstein, Webster et al., 2010).

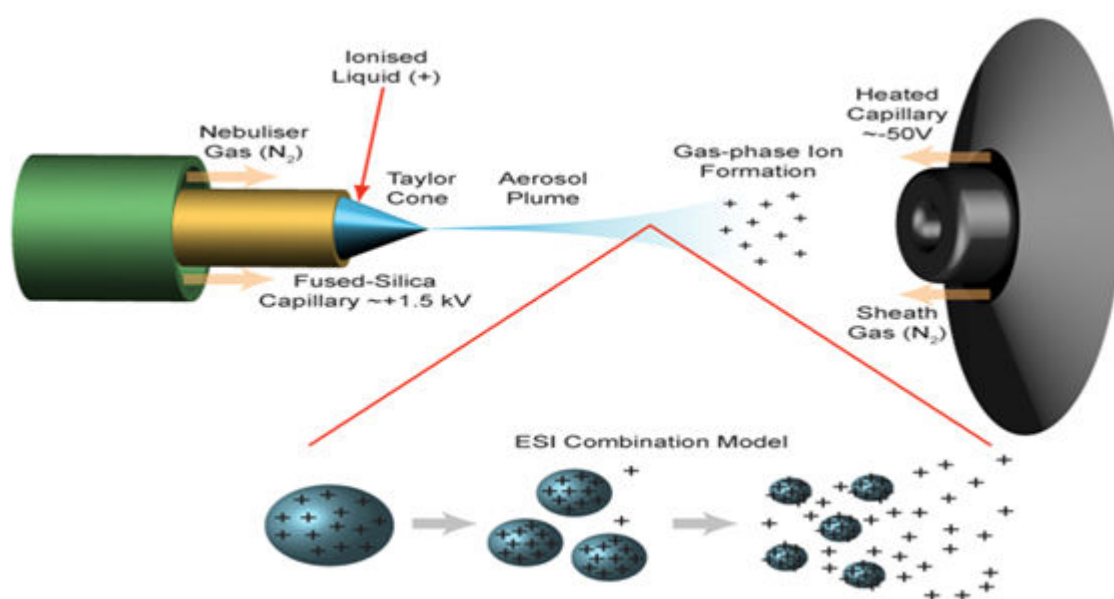


Figura 19 – Ionização por eletrospray (ESI) (Lamondlab, 2013a).

Existem diferentes tipos de analisador de massas, entre eles o analisador de massas com quadrupolo e por tempo de voo (TOF). No analisador de massas com quadrupolo há quatro tubos cilíndricos paralelos formando um túnel, no qual, aplicando radiofrequência e corrente contínua adequada, forma-se um campo eletrostático oscilante entre os tubos (Figura 20a). O analisador de massas com quadrupolo funciona como um filtro de massas, onde somente alguns íons com certo valor m/z são capazes de atravessar e chegar ao detector. Os íons com valores diferentes de m/z seguem trajetórias instáveis e saem do quadrupolo, não atingindo o detector (Dass, 2007; Silverstein, Webster et al., 2010).

Na espectrometria de massas em sequência (*Tandem Mass*), equipamentos de triplo-quadrupolo são largamente utilizados. Neste tipo de equipamento, três quadrupolos são dispostos sequencialmente. O primeiro quadrupolo (Q1) e o último (Q3) operam normalmente como filtro de massas, e o do meio (Q2) funciona como uma região de retenção de íons e como uma célula de colisão (Figura 20b). Em um equipamento de triplo-quadrupolo, os dados podem ser obtidos por diferentes modos de operação (Figura 21), o mais utilizado é o modo de *Product-ion scan*. O espectro obtido neste modo de operação é muito utilizado na elucidação de estruturas. Para adquirir este espectro, o equipamento é programado para que somente o íon precursor de interesse seja selecionado para fragmentação, obtendo-se um espectro de seus íons produtos específicos (Dass, 2007).

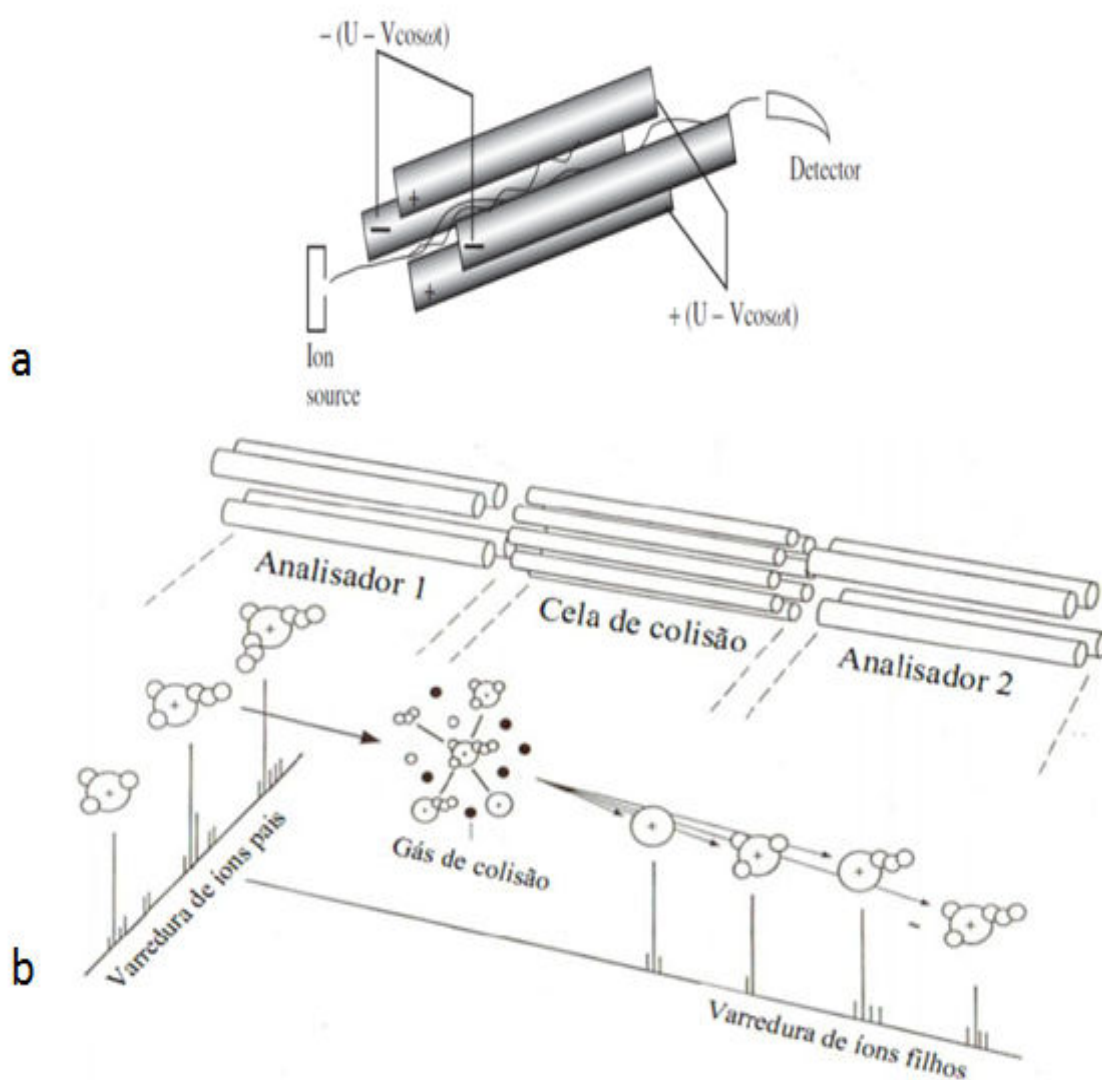


Figura 20 – (a) Analisador de massas com quadrupolo. Corrente contínua (U) e radiofrequência (V) (Dass, 2007). (b) Analisador de massas com triplo-quadrupolo (Xavier, 2010 *apud* Zancanaro, 2012).

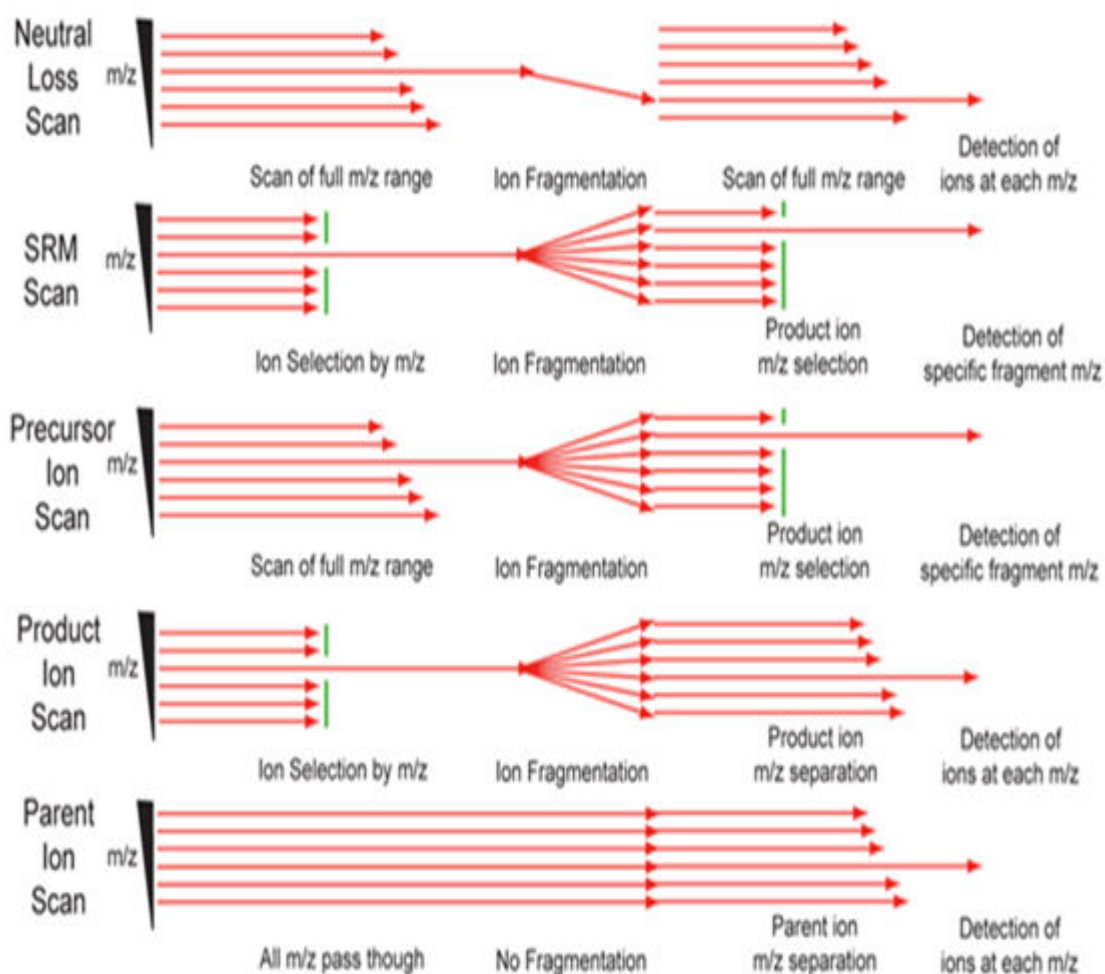


Figura 21 – Modos de operação dos espectrômetros de massa em sequência (Lamondlab, 2013b).

O analisador de massas por TOF é constituído de um longo tubo (de comprimento L) no qual os íons são separados baseados no tempo (t) em que os íons levam para atravessar o tubo e chegar ao detector (Eq. 5 e Figura 22). A velocidade (v) do íon é inversamente proporcional à raiz quadrada de sua razão massa carga e o tempo é a razão entre o comprimento do tubo (L) e a velocidade (v) (Dass, 2007):

$$v = \sqrt{\frac{2zV}{m}}, \quad t = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2zV}}$$

Eq. 5

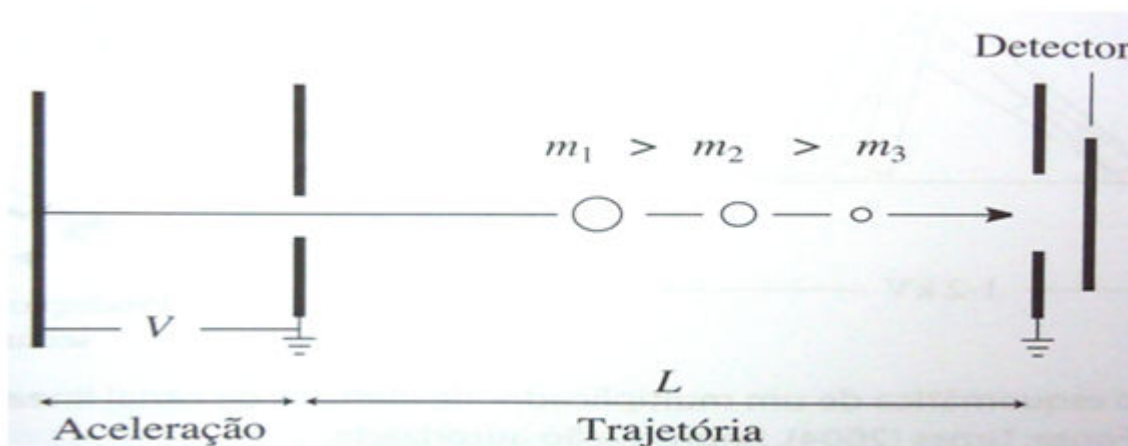


Figura 22 – Espectrômetro de massas por tempo de voo (TOF) (Pavia, Lampman et al., 2012).

Em um analisador TOF, quanto maior o tubo, maior o tempo de voo e maior a resolução do equipamento. Equipamentos de TOF de alta resolução podem ser utilizados para determinação de massa exata de compostos orgânicos com massa molecular < 500 u, com acurácia < 5 ppm (Dass, 2007).

Desde 1960, a espectrometria de massas vem sendo utilizada para elucidação de estruturas e identificação de compostos orgânicos. Um dos primeiros passos para elucidação da estrutura molecular de um composto orgânico é a determinação de sua massa molecular pela determinação do valor m/z do íon molecular. A partir do conhecimento do valor de m/z do íon molecular, obtém-se uma janela de opções da composição elementar do composto. Em espectrômetros de massas de alta-resolução, a massa molecular pode ser determinada com alta precisão, e então é possível deduzir a composição elementar. As massas atômicas dos isótopos não são números inteiros, característica que confere um único valor para massa molecular de cada composto ou cada fórmula. Por exemplo, uma fórmula molecular de 60,1 g/mol pode ter diferentes combinações elementares como C_3H_8O ($m = 60,05754$), $C_2H_8N_2$ ($m = 60,06884$), $C_2H_4O_2$ ($m = 60,02112$), CH_4N_2O ($m = 60,0342$), mas possuem somente um único valor de massa exata (Dass, 2007; Pavia, Lampman et al., 2012). O erro (ppm) de medida da massa observada de um composto deve ser menor que 5 ppm em relação a sua massa exata teórica (Eq. 6):

$$ppm = \frac{(massa\ exata\ teórica - massa\ observada)}{massa\ exata\ teórica} \times 10^6$$

Eq. 6

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estabelecer um protocolo para produção e purificação de citreoviridina com o principal intuito de obter material suficiente com pureza conhecida para conduzir estudos toxicológicos e ajudar a entender os eventos ocorridos no Brasil e em outras partes do mundo. Os objetivos específicos foram:

- Desenvolver metodologia para produção de citreoviridina a partir do fungo *Penicillium citreonigrum*;
- Desenvolver e otimizar metodologia para purificação de citreoviridina por HPLC, utilizando colunas semi-preparativas;
- Realizar análises espectrométricas para estabelecer a identidade e pureza da citreoviridina produzida.

**PURIFICATION AND SPECTROMETRIC CHARACTERIZATION OF
CITREOVIRIDIN PRODUCED BY *Penicillium citreonigrum* IN YEAST EXTRACT
SUCROSE (YES) MEDIA**

Mariana Wagner da Rocha,[†] Inês Sabioni Resck,[‡] Eloisa Dutra Caldas^{*,†}

[†] Faculty of Health Sciences and [‡]Chemistry Institute. University of Brasilia, Brasília, DF Brazil.

* Corresponding author

Laboratory of Toxicology, Tel/Fax: ⁺⁺55 61 3107-1875, e-mail: eloisa@unb.br

Abstract

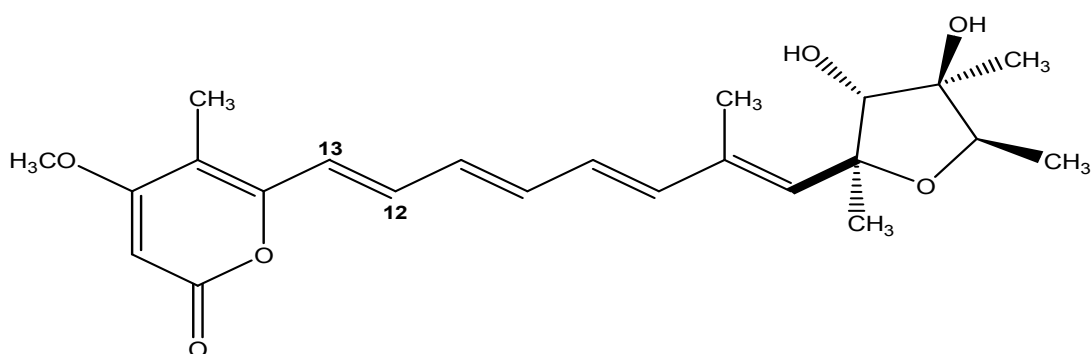
Citreoviridin, a mycotoxin produced by several *Penicillium* species, has been associated with the “yellow rice” disease, which has caused cardiac beriberi in Japan and an outbreak of beriberi in the State of Maranhão, Brazil. The main objective of this work was to establish a protocol for the production and purification of citreoviridin in order to yield enough high purity material to conduct toxicological studies. Citreoviridin was produced by *Penicillium citreonigrum*, cultivated in 500 mL YES liquid medium for 8 days at 25°C. The toxin was extracted with chloroform from the liquid medium and the mycelium of 48 culture flasks, and showed to contain, in average, 29.7 and 85.7 mg of citreoviridin, respectively. A total of 5.54 g was obtained from all 16 batches. About 12 g of the 15.3 g of crude extract was purified by semi-preparative HPLC, obtaining 3.25 g of purified citreoviridin (27.1% yield). The purified citreoviridin was characterized by UV/VIS, FT-IR, ¹H and ¹³C NMR, LC-MS/MS and LC-MSD TOF, and shown to be 100 pure by gravimetric analysis.

Keywords: mycotoxins, citreoviridin, production, purification, characterization

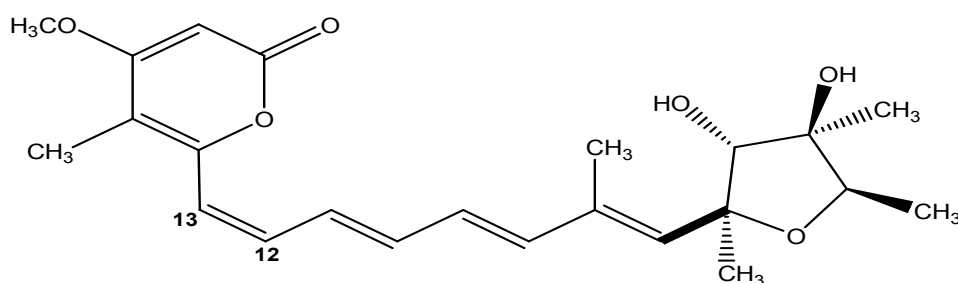
INTRODUCTION

Mycotoxins are toxins produced by several fungal species, belonging mainly to the genera *Claviceps*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Alternaria*. The fungi may develop in agricultural commodities in the field and/or during transport and storage ¹. Many mycotoxins and toxigenic fungi were discovered for being associated with human (ergotism, aflatoxicose) or animal disease (turkey-X-disease, equine leukoencephalomalacia) ².

Citreoviridin (Figure 1), a mycotoxin produced by several *Penicillium* species, was first isolated in 1947 during the investigation of the “yellow rice” disease. The rice was contaminated predominantly with one *Penicillium* species, later named *P. citreoviridide* Biore ³, or *P. citreonigrum* ⁴. The “yellow rice” disease caused acute cardiac beriberi, a disease which has been recognized for centuries in Japan ⁵. Beriberi is mainly caused by thiamin (vitamin B₁) deficiency and has four clinical forms. The wet beriberi and Shoshin beriberi affect mainly the cardiac system, and the dry beriberi and Wernicke-Korsakoff syndromes affect mostly the neural system ⁶.



CITREOVIRIDIN



ISOCITREOVIRIDIN

Figure 1. Citreoviridin and isocitreoviridin chemical structures.

Uraguchi ⁷ found that the ethanol extract of *P. citreoviride* produced the same neurotoxic symptoms as those observed in acute cardiac beriberi in animals, indicating the involvement of citreoviridin in the “yellow rice” disease. The author noted that the incidence of beriberi decreased after 1910, when rice inspection was introduced in Japan. Some studies have shown that citreoviridin inhibits triphosphate adenosine ⁸⁻¹⁰ and thiamine diphosphate, suggesting a relationship between anti-thiamine effect of citreoviridin and cardiac beriberi ¹¹.

Citreoviridin has also been associated with Keshan disease, an endemic cardiomyopathy that particularly affects children and young women in China and North Korea, and is characterized by acute or chronic episodes of heart disorder ¹². Citreoviridin may initiate Keshan disease mainly through a oxidative stress mechanism after the long-term consumption of moldy cereals, with the dietary deficiency of selenium, proteins, and vitamins C and E exacerbating the pathological damage ^{13, 14}. Other studies have shown that citreoviridin may cause degeneration and necrosis in cardiac myocytes *in vitro* and in myocardium of orally exposed rats ^{15, 16}.

In May 2006, an outbreak of beriberi was reported in the state of Maranhão, Brazil, and by 2008, 1207 cases of the disease were reported, with 40 deaths ¹⁷. Rice samples collected in the outbreak region were analyzed and presented high levels of contamination of many fungal species, including *Penicillium citreonigrum*, with five samples being positive for citreoviridin ¹⁸. Cases of beriberi are still reported in Maranhão, but it is debated whether these cases are associated with the consumption of rice contaminated with citreoviridin ¹⁹.

The objectives of this work were to establish a protocol for production and purification of citreoviridin in order to yield enough material with high purity to conduct toxicological studies to help understanding the events that occurred in Brazil and other parts of the world.

MATERIALS AND METHODS

Fungal culture. Culture of *Penicillium citreonigrum* (ITAL 2313/09) was supplied in agar medium by Dr. Marta Taniwaki (ITAL, Brazil). The identity of the culture was confirmed by the Fungal Molecular Genetics Laboratory (UEL, Brazil), through sequencing of the beta-tubulin gene and comparison with the nucleotide sequence from databases of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Subcultures of *Penicillium citreonigrum* were maintained in Malte Extract Agar (MEA) and in Yeast Extract Sucrose agar (YESA) media.

Production of citreoviridin. For mass toxin production, a YESA subculture plate was incubated for seven days, the medium equally divided into 6 parts. Two parts were randomly taken to inoculate a Yeast Extract Sucrose (YES) liquid medium (500 mL in 4 L Erlenmeyer), which is particularly useful for mycotoxin production by *Penicillium* genera ²⁰. The YES culture flasks were cultivated in stationary mode, at 25°C, protected from light. In order to evaluate the best incubation time for toxin production, the culture was monitored during 15 days, and the production evaluated on each day from day 4 (extraction and quantification are described below), this experiment was performed in duplicated. For mass citreoviridin production, one batch of three culture flasks incubated for 8 days was produced at each time, with a total of 16 batches over 16 weeks (not consecutive), and 48 culture flasks.

Extraction of citreoviridin. The content of the culture flask was filtered through a paper filter and citreoviridin was extracted, separately, from both liquid medium and mycelium. The liquid medium was divided into two portions of 250 mL, each portion extracted twice with 20 mL of chloroform. The mycelium was transferred to a becker and chloroform was added until the mycelium surface was covered (about 100 mL). Mycelium extraction conditions with sonication or agitation were tested at 10, 20, 30 and 40 minutes. Sonication was slightly more efficient in extracting citreoviridin than agitation and thus was the method chosen, as it is simpler and easier to operate under the laboratory routine. The best results were obtained at 20 minutes of sonication. Liquid medium and mycelium extracts were

filtered under anhydrous sodium sulfate, combined and evaporated to dryness to obtain the crude toxin extract.

Citreoviridin quantification. Citreoviridin quantification was performed on a Shimadzu HPLC system equipped with a quaternary pump (LC-20AT), a degasser (DGU-20A), a system controller (CBM-20A), an autosampler (SIL-20A), a column oven (CTO-20A), and a photo-diode array detector (PDA SPD-M20A) (Kyoto, Japan). Chromatographic separations were performed in a Gemini C18 reversed-phase analytical column (150 x 4.6 mm, 5 μ m) preceded by a security guard cartridge (4.0 x 3.0 mm, 5 μ m), both from Phenomenex (Torrance, CA, USA). The mobile phase used was methanol:water with 1% of acetic acid (65:35) at a flow rate of 1.0 mL/min. The column oven temperature was set at 40°C. Injection volume was 10 μ L and wavelength set at 385 nm. Citreoviridin standard (5 mg; 97% purity) was purchased from Enzo Life Sciences International Inc. (Farmingdale, NY, USA). Stock solution (50 μ g/mL) was prepared in ethyl acetate and working solutions (2.5 μ g/mL) in methanol. Standard curves were in the range of 0.5 to 5.0 μ g/mL (six calibration points). An aliquot of 10 μ L was taken from each crude toxin extract, evaporated, dissolved and diluted in methanol to achieve a citreoviridin concentration within the standard curve range. All extracts were filtered through syringe filters (0.45 μ m) before HPLC analysis.

Purification. The purification of the fungal extracts was performed in the Shimadzu HPLC-PDA system coupled to a FC-203B fraction collector (Gilson Middleton, WI, USA) using a Gemini C18 semi-preparative column (150 x 10 mm, 5 μ m), preceded by a security guard cartridge (10 x 10 mm, 5 μ m), both from Phenomenex (Torrance, CA, USA), at a flow rate of 5 mL/min. The column oven and mobile phase were as described above. The crude toxin extracts were diluted with the mobile phase (~ 50 mg/mL; methanol:water with 1% of acetic acid - 65:35), filtered with a 0.45 μ m syringe filter and aliquots of 1 mL injected into the system. The absorbance was monitored by PDA detector and the fraction collector was programmed to collect five fractions during each run. The citreoviridin peak was monitored at 385 nm, the collected fractions were concentrated on a rotary-evaporation, and lyophilized for further characterization.

Characterization. Ultraviolet/Visible Spectroscopy analysis of the purified citreoviridin fraction, in methanol, was performed on a Shimadzu UV/VIS 1650PC spectrophotometer (Kyoto, Japan) at a 190 to 800 nm wavelength range.

Nuclear Magnetic Resonance Spectrometric (NMR) analysis was performed on a Varian Mercury Plus spectrometer (7.05 T) operating at 300 MHz for ^1H and at 75.46 MHz for ^{13}C . The analysis was conducted with purified citreoviridin dissolved in CD_3OD and in CD_2Cl_2 , using TMS (Me_4Si) as internal reference. The ^1H and ^{13}C -NMR chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to TMS (^1H -NMR) and CDOH and CD_2Cl_2 (^{13}C -NMR), coupling constants as J (Hz) and multiplicities as doublet (d), doublet of doublets (dd), quartet (q) and singlet (s). In the homonuclear and heteronuclear two-dimensional experiments (COSY, HMQC and HMBC), the field gradient mode was used.

Infrared Spectrometric (IR) analysis was performed on a Varian 640 FTIR spectrometer with a KBr Beam splitter. The purified citreoviridin was dried at 130°C and prepared in KBr pellet. The spectrum was registered in the range of $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ with 2 cm^{-1} spectral resolution.

LC-MS/MS analyses were performed in a Shimadzu LC-20AD liquid chromatographer from Shimadzu (Kyoto, Japan), coupled with a Applied Biosystems/MDS Sciex 4000 QTRAP MS mass spectrometer system (Foster City, USA), with an electrospray interface (ESI). Chromatographic columns were the same as described above for citreoviridin quantification. The mobile phase used was methanol: water with 0.1% of formic acid (65:35) at a flow rate of 1.0 mL/min. The column oven temperature was set at 40°C and 10 μL injection volume was used. The full scan and product ion scan analyses were performed by direct infusion of a 200 ng/mL citreoviridin (purified and standard) solution (50:50 methanol:water (with 0.1% of formic acid) in the mass spectrometer, at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. The parameters optimized for Multiple Reaction Monitoring (MRM) were 56 V declustering potential, 13 V collision energy for fragment m/z 315 and 33 V for fragment m/z 139 and 10 V collision cell exit potential for both fragments. Ion source parameters were optimized by Flow Injection Analysis (FIA) using a 20 ng/mL citreoviridin standard solution at a 1 mL/min flow rate and the same mobile phase, and were as follow: 20 psi curtain gas, median collision gas, 4000 ion spray voltage, 600°C source temperature, 50 V ion source gas.

The exact mass analysis was performed on a LC-MSD TOF (Agilent 1100 Series; Santa Clara, CA, USA) coupled to an positive ESI source (3500 V capillary, 55 psig nebulizer, 12 L/min drying gas, 350°C gas temp, 120 V fragmentor and 60 V skimmer) and a mass selective time-of-flight detector (TOF). Chromatographic separations were performed on a Zorbax Eclipse Plus C18 reversed-phase analytical column (150 x 4.6 mm, 3.5 µm) from Agilent (Santa Clara, CA, USA). Mobile phase was methanol:water with 0.1% of formic acid (65:35) at a flow rate of 0.45 mL/min. The column oven temperature was set at 40°C and the injection volume was 5 µL.

Gravimetric analysis. A 10 mL aliquot of the purified citreoviridin solution was transferred to a pre-weighed flask (analytical balance Bel Mark model 210A with a measuring uncertainty of 0.000058 for 0.1000 g), the solvent dried under nitrogen at room temperature and the flask re-weighed for toxin mass estimation. This procedure was repeated in triplicate. The citreoviridin content in the aliquot was quantified by HPLC against a citreoviridin standard curve made with the commercial standard.

RESULTS AND DISCUSSION

Citreoviridin production. *P. citreonigrum* growth in YES medium and citreoviridin production were monitored in the liquid medium for 15 days. The fungus showed fast growth, covering the entire medium surface (approximately 20 cm) after 4 days of incubation (Figure 2). Citreoviridin production increased from day 4, reaching a maximum on the 8th day, with further variation up to day 15 (Figure 3). Ueno ³ evaluated citreoviridin production by *P. citreoviride* in five different culture media (Mannit, Czapeck, Glycerine-Czapek, Waksman and Ushinsky media) and incubation temperature. Even under the best conditions (20-24°C in Ushinsky medium), the highest citreoviridin production was obtained only after 2 or 3 weeks of incubation.



Figure 2. *P. citreonigrum* growth in YES medium with 4 and 8 days of incubation.

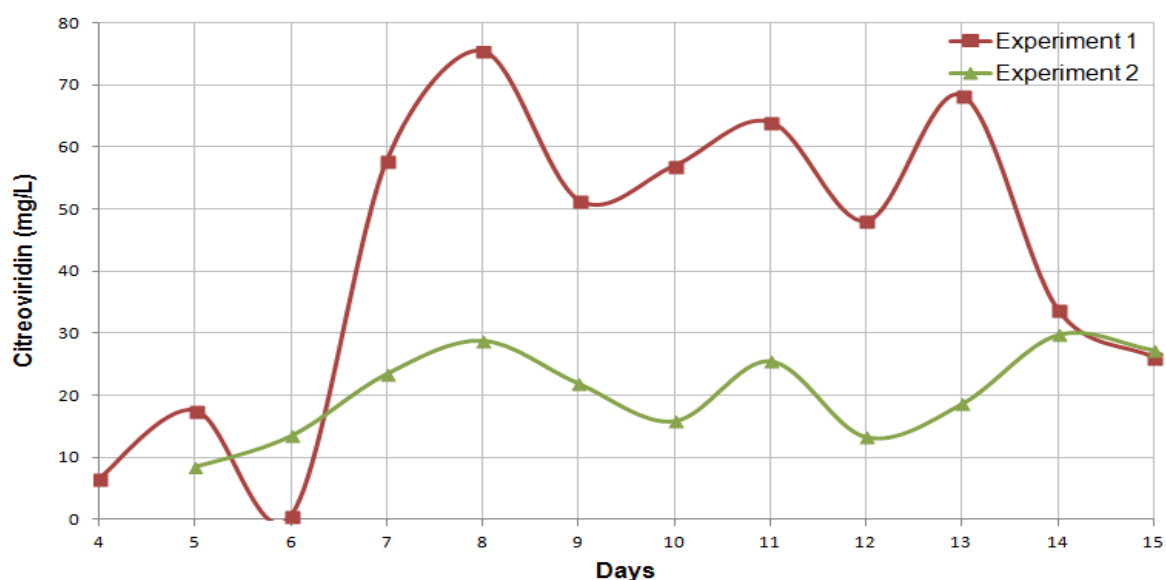


Figure 3. Citreoviridin production by *Penicillium citreonigrum* cultivated in YES liquid medium at 25°C during 15 days. It was performed in duplicated (experiment 1 and 2).

The three culture flasks of one batch were incubated in parallel, under controlled temperature and protected from light, which visually showed similar fungus growth. Table 1 summarizes the citreoviridin obtained from the batches. Toxin production varied considerably within each batch, with a coefficient of variation in the liquid medium ranging from 1.1 to 68.7% and in the mycelium from 5.7 to 125%. This large variation is most likely due to the differences in the size of inoculums taken from the YESA subculture plate to inoculate each YES culture flask, which was also described for other fungi²¹.

Table 1. Production of citreoviridin by *P. citreonigrum* in YES medium grown for 8 days at room temperature

Batch	Crude extract (mg)	Citreoviridin (mg) ^a (CV%)		Total citreoviridin (mg)	Yield (%) ^b
		from liquid medium	from mycelium		
1	653.4	37.7 (29.7)	92.1 (34.9)	389.3	59.6
2	210.9	21.3 (28.6)	36.6 (40.8)	173.7	82.4
3	469.1	40.7 (9.2)	99.9 (8.7)	421.8	89.9
4	1149.4	39.7 (1.1)	71.9 (18.8)	334.8	29.1
5	966.5	34.7 (10.4)	151.8 (15.4)	559.7	57.9
6	344.0	32.1 (16.1)	35.7 (19.4)	203.3	59.1
7	990.0	38.3 (9.0)	153.2 (15.4)	574.7	58.0
8	1431.7	29.6 (9.6)	83.1 (5.7)	338.2	23.6
9	1431.7	31.7 (4.1)	46.8 (44.2)	235.3	16.4
10	1089.3	14.5 (68.7)	28.3 (125.2)	128.6	11.8
11	1089.3	23.5 (10.4)	30.3 (69.3)	161.2	14.8
12	1272.3	24.8 (7.4)	80.6 (35.7)	316.2	24.9
13	2036.4	31.4 (2.8)	150.6 (6.4)	546.1	26.8
14	776.4	28.0 (3.7)	102.5 (5.7)	391.4	50.4
15	519.1	27.7 (7.6)	68.4 (18.9)	288.2	55.5
16	851.0	19.8 (10.9)	139.9 (16.5)	479.1	56.3
Mean	955.0	29.7	85.7	346.3	44.8
(CV%)	(49.0)	(25.5)	(52.1)	(41.7)	(53.8)
Total, g	15.28	1.43	4.11	5.54	

^a mean of three culture flasks; ^b Total citreoviridin (liquid medium plus mycelium)*100/crude extract.

Almost three times more citreoviridin was obtained from the mycelium than from the liquid medium (mean of 85.7 and 29.7 mg, respectively; Table 1; Figure 4). A larger variation in toxin levels among the batches was also found in the mycelium (52.1%) when compared with the liquid medium (25.5%) (Table 1). Ueno³ found that the proportion of citreoviridin extracted from mycelia in comparison with the liquid medium (broth) depends on the substrate. The same amount of toxin was recovered from the liquid medium and mycelia in the Mannit culture, about 3 times more citreoviridin was extracted from the liquid medium than mycelia of the Waksman and

Glycerin-Czapek cultures, and mycelium from the Ushinsky culture contained over seven times more citreoviridin than the liquid medium³.

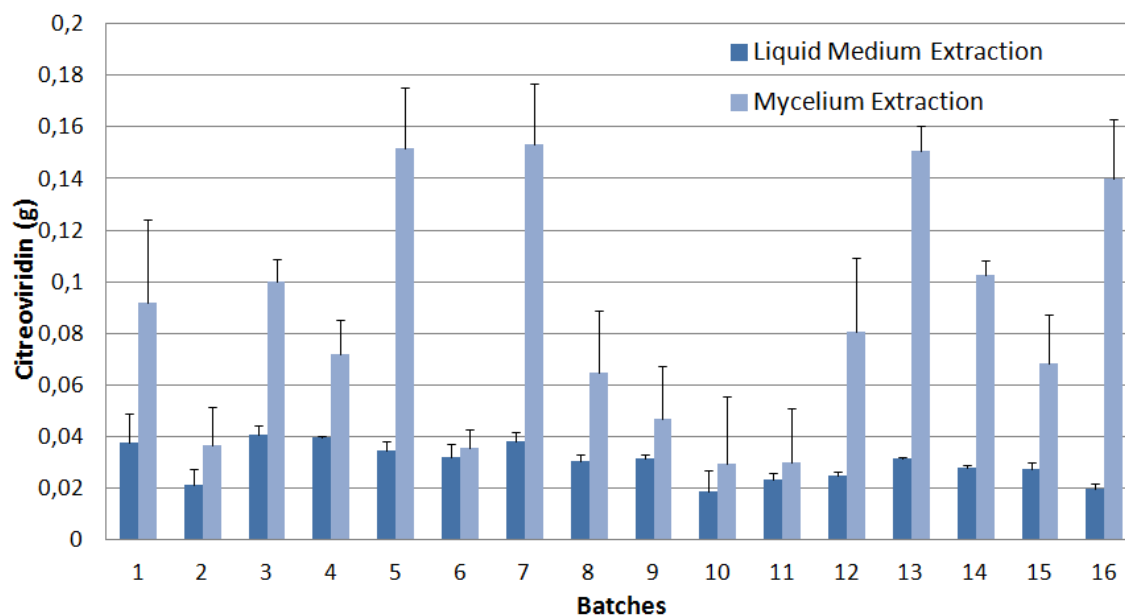


Figure 4. Citreoviridin extraction from the mycelium than from the liquid medium.

Crude extract mass varied from 210.9 to 2036 mg (mean of 955 mg, CV=49%), reaching a total of 15.3 g. The yield of citreoviridin in the crude extract varied greatly between the batches, with a mean of 44.8% (11.8 to 89.9 %, Table 1; Figure 5).

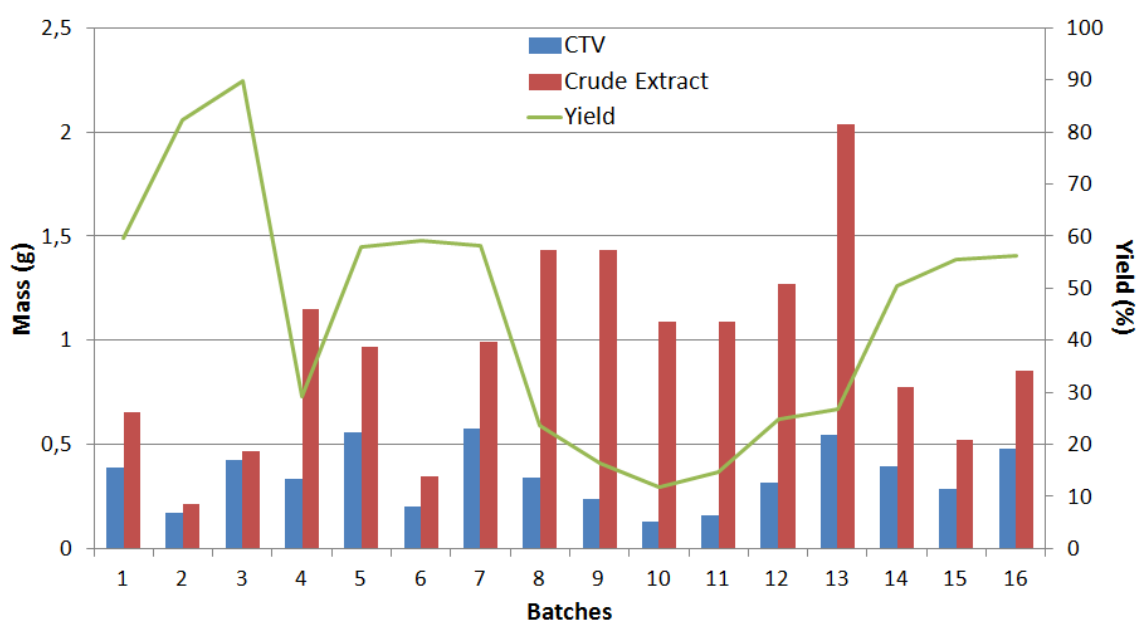


Figure 5. Yield of citreoviridin in the crude extract on the batches.

On average, a total of 346.3 mg of citreoviridin were extracted from the liquid medium and mycelium in each culture medium batch (230.9 mg/L), with a total of 5.54 g toxin obtained from the 16 batches (Table 1). Ueno ³ and Datta, Ghosh ¹¹ reported a higher toxin production using Ushinsky media: 380 mg/L and 2,6 g/L (only mycelium), respectively. Steyn et al ²² obtained 220 mg/L of toxin from the mycelium of 1L F14 medium 12 days after inoculation with *P. pulvillorum*.

Purification. The five fractions collected during the purification of the crude toxin extract by semi-preparative HPLC are shown in Figure 6. Equal aliquots (without dilution or concentration) were taken from each fraction for HPLC analysis. The chromatograms of each fraction are shown in Figure 7. Fraction 4 showed only the citreoviridin peak, and was considered as the purified citreoviridin fraction. Fraction 2 was later identified to contain isocitreoviridin (Figure 1). No other compound was found at significant concentration in any other fraction. Fractions 3 and 5 contained small amounts of citreoviridin, but they were not investigated further.

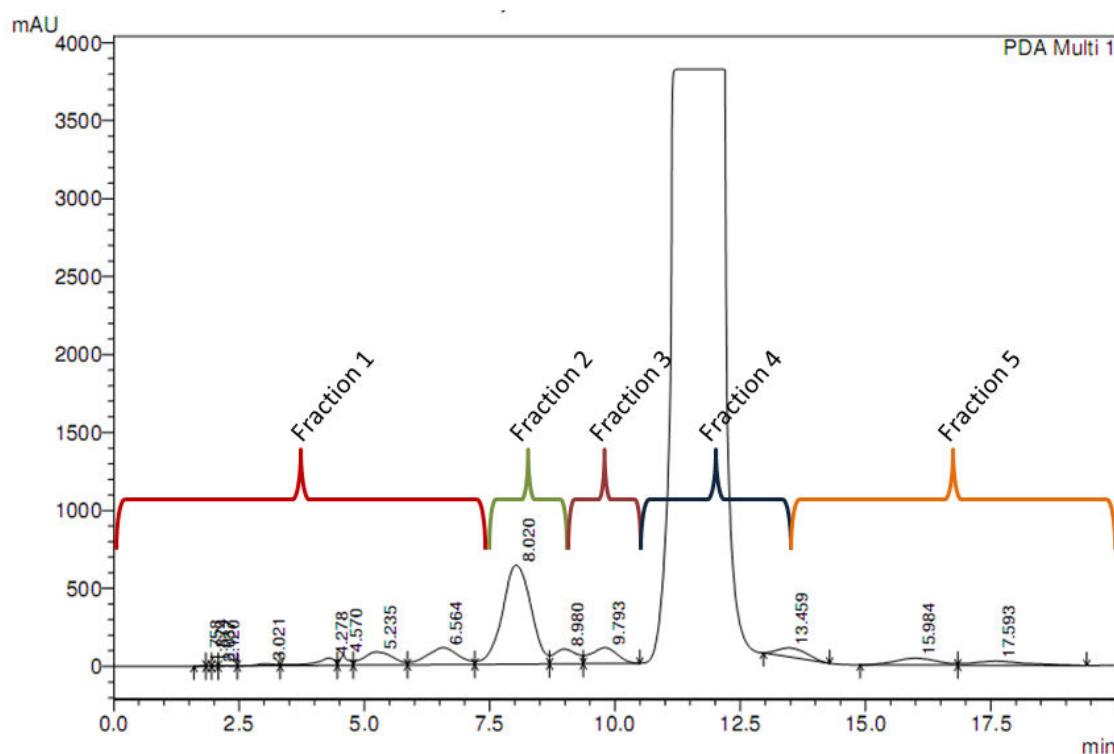


Figure 6. HPLC-PDA chromatogram under semi-preparative conditions of a YES culture medium inoculated with *Penicillium citreonigrum*. The fractions were monitored at 385 nm.

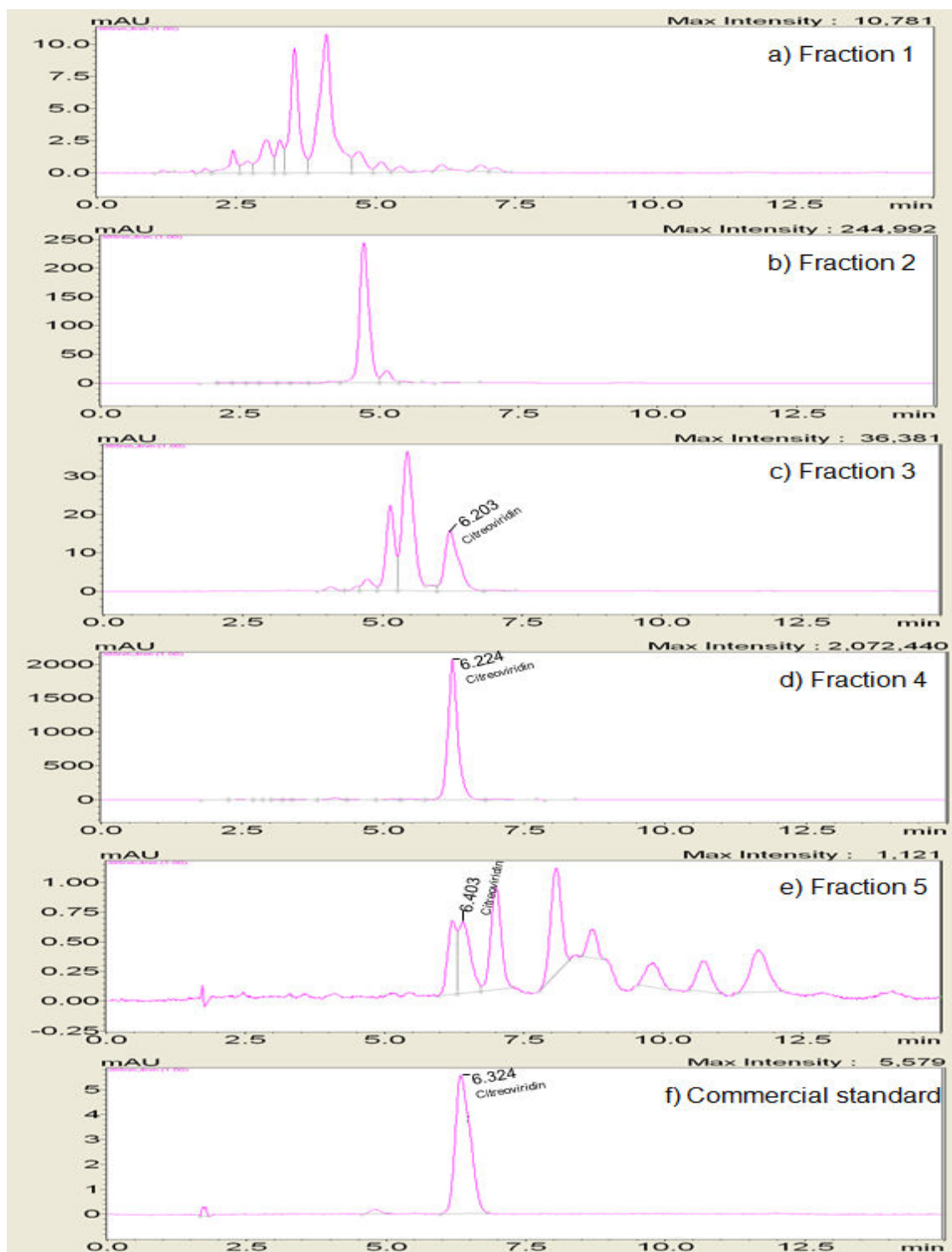


Figure 7. HPLC-PDA chromatograms (385 nm) of crude extract fractions obtained from a semi-preparative column. The chromatograms are in different scales.

Fractions 4 collected from 243 injections of the crude extract (1 mL injections of a 50 mg/mL extract, about 12 g of the 15.3 g total crude extract obtained) were concentrated in rotary evaporator and lyophilized. A total of 3.25 g of purified citreoviridin (estimated by HPLC) were obtained, resulting in a yield of about 27.1% (purified citreoviridin/crude extract). Datta, Ghosh ¹¹ and Ueno ³ found higher yields using the Ushinsky medium than those found in our work (38% and higher than 67%, respectively, calculated from the data provided). This is the first time that citreoviridin has been purified by semi-preparative HPLC. Other studies have used liquid-liquid partition and silica-gel column chromatography ^{3, 11, 22-24}, purification techniques considered are less efficient than semi-preparative HPLC. The purity of the toxins produced in these studies were not reported.

The purified citreoviridin is a yellow-orange amorphous solid and an attempt to recrystallize it to determine its melting point was not successful.

Characterization

UV/Vis. UV/Vis spectrum in methanol showed the highest absorptions at 201, 230, 285, 294, and 384 nm (Figure 8), identical to the citreoviridin standard and similar to what is reported in the literature ^{3, 23, 25}. The absorption at 384 nm, near to visible, showing the yellow color and indicated the presence of double bonds in extensive conjugations.

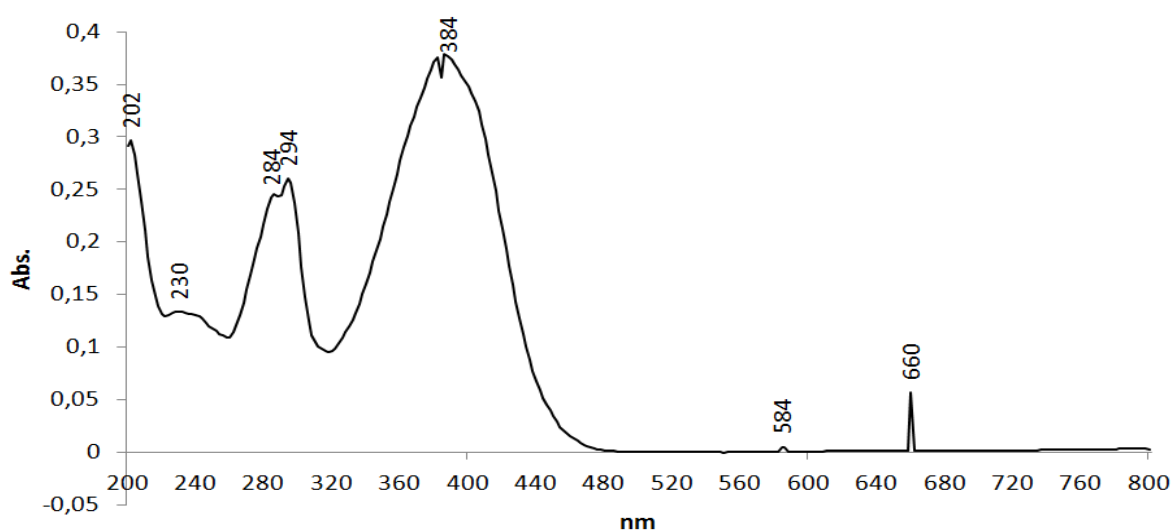


Figure 8. UV-spectrum of the purified citreoviridin (5 µg/mL) in methanol.

FT-IR. FT-IR spectrum (Figure 9) showed the major absorptions at 3431 (OH), 2964 (CH₃), 2929 (CH), 1691 (C=O), 1625 (C=C), 1457 and 1385 (CH₃), 1261, 1095 and 1020 (C-O), and 802 (C=C trisubstituted) cm⁻¹. These data are similar to what have been reported in the literature ^{3, 23}.

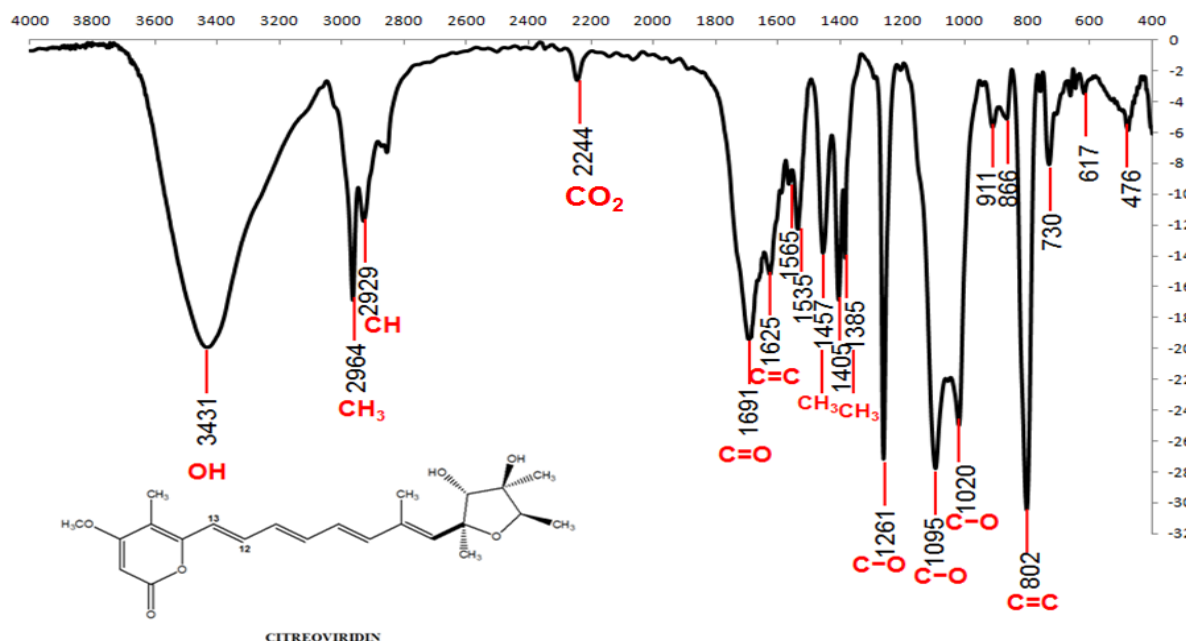


Figure 9. Infrared spectrum of the purified citreoviridin (fraction 4).

NMR. NMR data of the purified citreoviridin dissolved in CD₃OD and CD₂Cl₂ and data from literature are shown in Table 2. ¹H and ¹³C NMR data for citreoviridin in both solvent were in good agreement, within the experimental error, with the data reported by Suh and Wilcox ²⁶ (CD₂Cl₂) and Steyn et al. ²² (CDCl₃). All chemical-shifts were confirmed by COSY experiment (¹H-¹H homonuclear through-bond (J-coupling) correlations), and by HMQC and HMBC experiments (¹H-¹³C heteronuclear correlations). The ¹³C and ¹H NMR spectra of the crude extract and the purified citreoviridin illustrate the efficiency of the purification process (Figure 10 e 11). Comparing the ¹H and ¹³C NMR spectra of the citreoviridin indicated the presence of a α -pyrone moiety [δ_C 163.7 (C-18), 89.0 (C-17), 171.1 (C-16), 108.4 (C-15), 154.9 (C-14) and 56.7 (C-23, OCH₃); δ_H 5.30 (s, H-17), 1.96 (s, H-22) and 3.83 (s, H-23, OCH₃)] (Table 2). The carbon chemical shifts observed at δ_C 141.7 (C-6), 135.8 (C-7), 141.1 (C-8), 127.6 (C-9), 138.8 (C-10), 131.6 (C-11), 134.7 (C-12), 119.4 (C-13), 154.9 (C-14), 108.4 (C-15), 171.1 (C-16), 89.0 (C-17) and 163.7 (C-18) showed the presence of the conjugated double bonds of citreoviridin (Table 2).

Table 2. NMR data of purified citreoviridin dissolved in CD₃OD and CD₂Cl₂ and data from literature ²⁶.

Position	δ_H (ppm) (J . Hz)			δ_C (ppm)		
	Exp	Exp	Lit ²⁶	Exp	Exp	Lit ²⁶
	CD ₃ OD	CD ₂ Cl ₂	CD ₂ Cl ₂	CD ₃ OD	CD ₂ Cl ₂	CD ₂ Cl ₂
1	1.13d (6.3)	1.13d (6.3)	1.14d (6.3)	13.0	12.5	12.6
2	3.73q (6.3)	3.77q (6.3)	3.79q (6.3)	79.1	77.9	78.0
3	-	-	-	81.4	81.0	81.1
4	3.90s	3.93s	3.97s	86.8	86.3	86.2
5	-	-	-	85.9	84.4	84.4
6	5.94s	5.44s	5.44s	144.7	141.7	142.2
7	-	-	-	137.4	135.8	136.0
8	6.41d (15.0)	6.37d(15.9)	6.34d(15.2)	142.7	141.1	141.3
9	6.34dd (15.3; 9.0)	6.35dd (15.5; 9.6)	6.31dd (15.3; 9.3)	127.7	127.6	127.5
10	6.62dd (14.8; 9.0)	6.57dd (14.4; 9.9)	6.54dd (14.7; 9.4)	140.3	138.8	139.0
11	6.51dd (15.0; 11.1)	6.46dd (14.4; 11.0)	6.41dd (14.7; 11.2)	132.0	131.6	131.4
12	7.15dd (15.0; 11.2)	7.13dd (15.0; 11.0)	7.14dd (14.9; 11.2)	133.6	134.7	134.4
13	6.49d (15.0)	6.39d(15.0)	6.38d (15.1)	119.6	119.4	119.2
14	-	-	-	156.1	154.9	154.9
15	-	-	-	109.5	108.4	108.4
16	-	-	-	173.1	171.1	171.2
17	5.61s	5.30s	5.30s	88.9	89.0	88.8
18	-	-	-	166.5	163.7	163.9
19	1.16s	1.17s	1.18s	19.4	17.6	17.8
20	1.31s	1.33s	1.34s	22.0	21.5	21.5

21	1.90d (1.2)	1.91d (1.2)	1.92d (1.2)	13.7	13.7	13.6	
22	1.99s	1.96s	1.96s	8.9	9.1	9.0	
23	3.89s	3.83s	3.82s	57.3	56.7	56.7	
Position	δ_{H} (ppm) (<i>J</i> . Hz)			Multiplicity	δ_{C} (ppm)		
	CD ₃ OD	CD ₂ Cl ₂	Literature CD ₂ Cl ₂		CD ₃ OD	CD ₂ Cl ₂	Literature CD ₂ Cl ₂
1	1.13 (6.3)	1.13 (6.3)	1.14 (6.3)	Doublet	13.0	12.5	12.6
2	3.73 (6.3)	3.77 (6.3)	3.79 (6.3)	quartet	79.1	77.9	78.0
3	-	-	-	-	81.4	81.0	81.1
4	3.90	3.93	3.97	singlet	86.8	86.3	86.2
5	-	-	-	-	85.9	84.4	84.4
6	5.94	5.44	5.44	Singlet	144.7	141.7	142.2
7	-	-	-	-	137.4	135.8	136.0
8	6.41 (15.0)	6.37 (15.9)	6.34 (15.2)	Doublet	142.7	141.1	141.3
9	6.34 (15.3; 9.0)	6.35 (15.5; 9.6)	6.31 (15.3; 9.3)	doublet of doublets	127.7	127.6	127.5
10	6.62 (14.8; 9.0)	6.57 (14.4; 9.9)	6.54 (14.7; 9.4)	doublet of doublets	140.3	138.8	139.0
11	6.51 (15.0; 11.1)	6.46 (14.4; 11.0)	6.41 (14.7; 11.2)	doublet of doublets	132.0	131.6	131.4
12	7.15 (15.0; 11.2)	7.13 (15.0; 11.0)	7.14 (14.9; 11.2)	doublet of doublets	133.6	134.7	134.4
13	6.49 (15.0)	6.39 (15.0)	6.38 (15.1)	doublet	119.6	119.4	119.2
14	-	-	-	-	156.1	154.9	154.9
15	-	-	-	-	109.5	108.4	108.4
16	-	-	-	-	173.1	171.1	171.2
17	5.61	5.30	5.30	singlet	88.9	89.0	88.8
18	-	-	-	-	166.5	163.7	163.9
19	1.16	1.17	1.18	singlet	19.4	17.6	17.8
20	1.31	1.33	1.34	singlet	22.0	21.5	21.5
21	1.90 (1.2)	1.91 (1.2)	1.92 (1.2)	doublet	13.7	13.7	13.6

22	1.99	1.96	1.96	singlet	8.9	9.1	9.0
23	3.89	3.83	3.82	singlet	57.3	56.7	56.7

Exp: experimental; Lit: literature; s: singlet; d: doublet; q:quartet; dd: doublet of doublets.

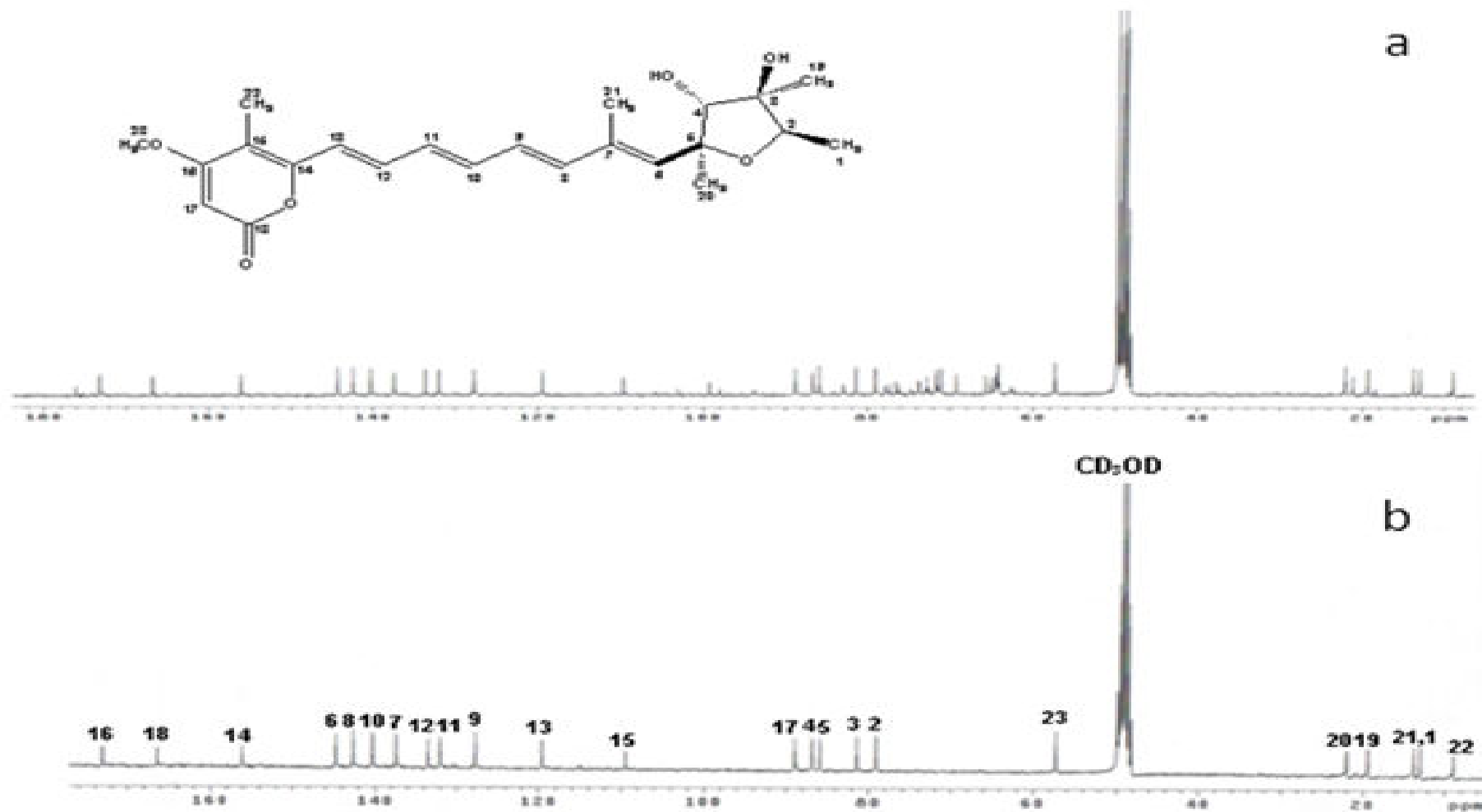


Figure 10. The ^{13}C NMR spectra (75.46 MHz) of (a) crude toxin extract and (b) purified citreoviridin in CD_3OD .

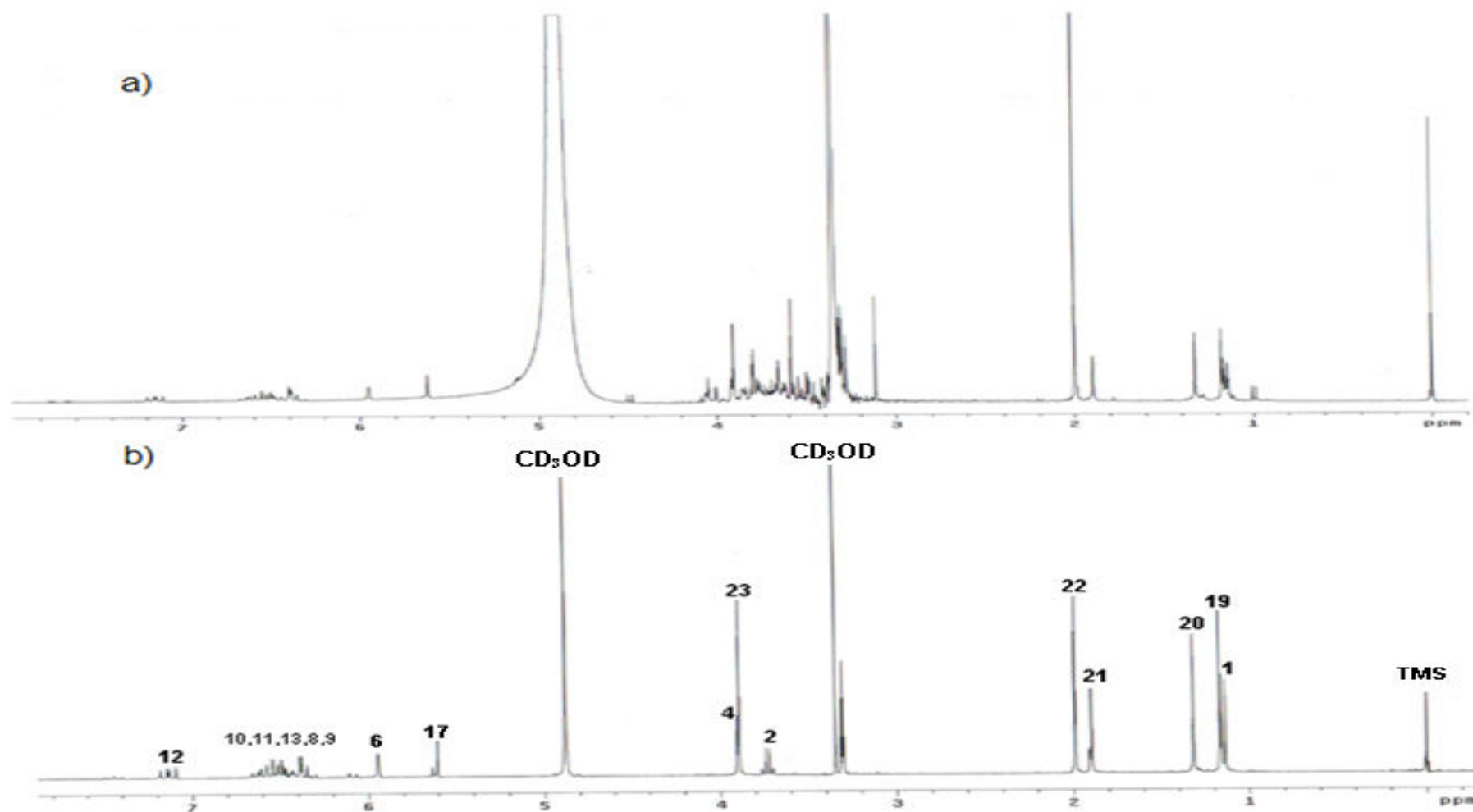


Figure 11. The ^1H NMR spectra of (a) Crude toxin extract and (b) Purified citreoviridin at 300 MHz in CD_3OD .

LC-MS/MS. The mass spectrometry analysis performed by LC-MS/MS showed a molecular ion peak $[M+1]$ at 403.2 m/z (Figure 12). A product ion scan was performed under different collisions energy and the major fragment ions were found at m/z of 315.1 (100%), 139.0 (67.5%), 297.1 (65.7%), 285.2 (54.9%) and 143.1 (25.6%) (Figure 12, insert). This fragmentation profile and ion abundances were similar to those found for the analytical standard of citreoviridin. The m/z 315 and 139 may be selected as quantification and confirmation ions, respectively, on a routine citreoviridin analysis in food matrices. The figure 13 show the possible fragmentation of citreoviridin (molecular ion, m/z 403.2) with a neutral loss of 88 Da, which is possible via a cross-ring fragmentation through the 5-membered ring. This fragmentation profile has not been published previously in the literature.

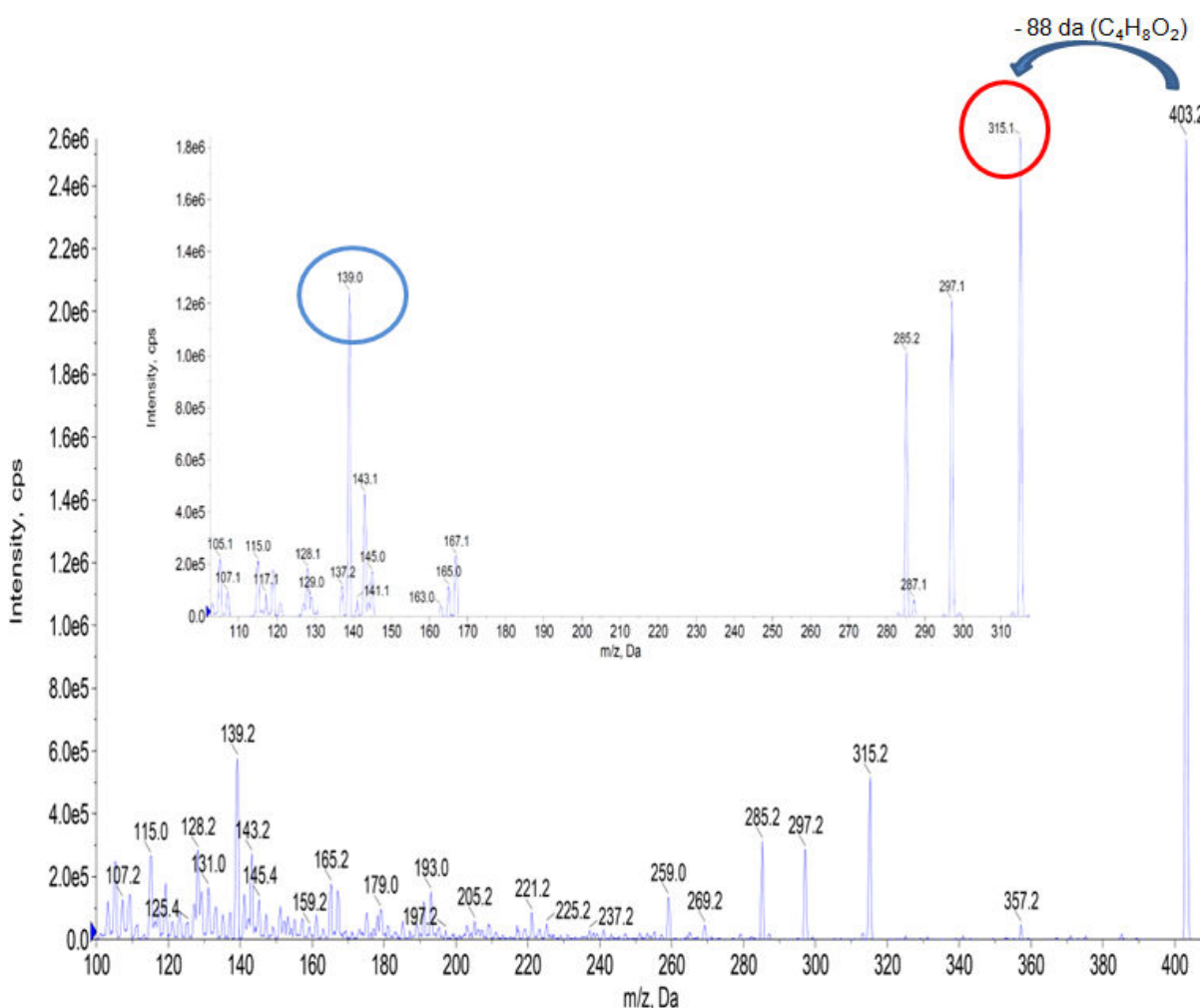


Figure 12. Product ion scan obtained by LC-MS/MS of the purified citreoviridin 403.2 m/z ($[M+H]^+$)

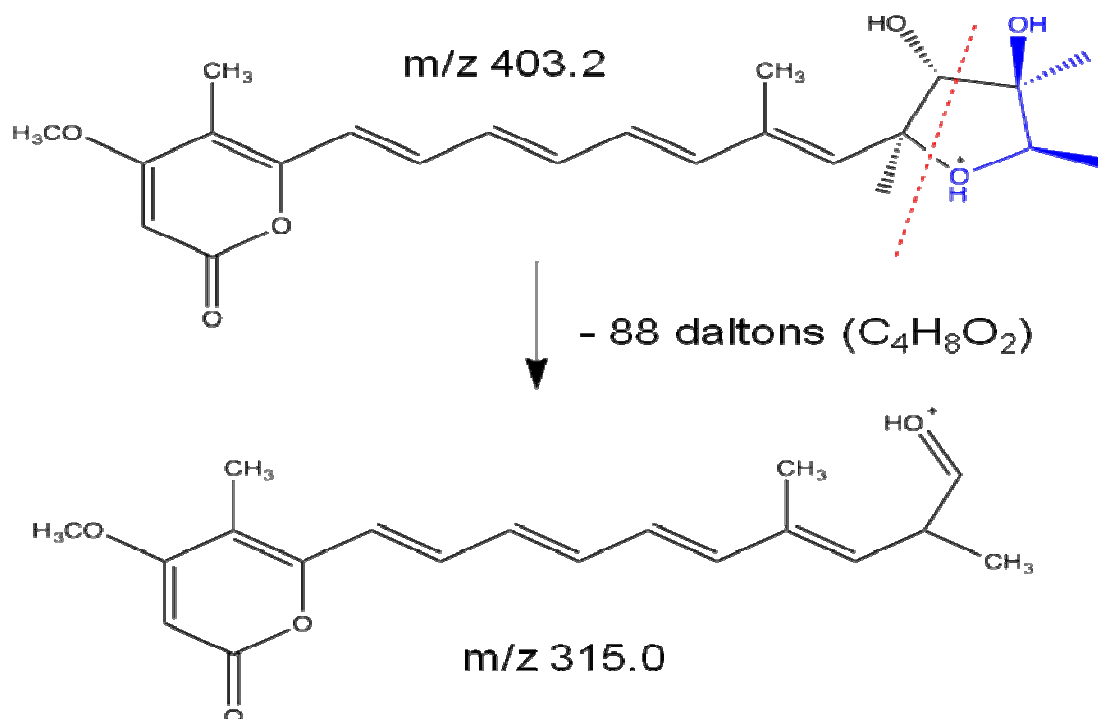


Figure 13. Citreoviridin (m/z 403.2) fragmentation, with a neutral loss of 88 Da, resulting in the m/z 315.0 fragment.

LC-MSD TOF. The determination of the exact mass of the purified citreoviridin (theoretical mass of 402.2042) was performed by LC-MSD TOF. The molecular ion $[M+H]^+$ was 403.2112 m/z , with a calculated mass of 402.2039, attributable to the molecular formula $C_{23}H_{30}O_6$ (score 97.96). LC-MSD TOF was also obtained for fraction 2, which contains isocitreoviridin and citreoviridin and of the commercial citreoviridin standard. A summary of the results is shown in Table 3.

Table 3. Measured mass of commercial standard, purified citreoviridin (fraction 4) and fraction 2 obtained by LC-MSD TOF, and mass accuracy attributed to molecular formula $C_{23}H_{30}O_6$ (theoretical mass 402.2042).

Material	Compound	Retention time (min)	$[M+H]^+$ m/z	Measured mass, g/mol	Mass accuracy (ppm)
Standard	citreoviridin	6.8	403.2131	402.2059	4.22
Fraction 4	citreoviridin	6.8	403.2112	402.2039	0.74
Fraction 2	isocitreoviridin	5.2	403.2116	402.2043	0.24
	citreoviridin	6.8	403.2119	402.2047	1.2

Mass accuracy = $[| \text{measured mass} - \text{theoretical mass} | * 1000000] / \text{theoretical mass}$

The citreoviridin peak was not present in the first analyses of Fraction 2 (Figure 7). When this fraction was reanalyzed after being stored for about 10 months at -15 °C in an amber flask, a significant peak was observed, showing that the Z/E isomerization at the C12-C13 double bond occurred in the isocitreoviridin structure (Figure 1) ²⁷. This conversion reached a ratio of 3:4 isocitreoviridin:citreoviridin (Figure 14).

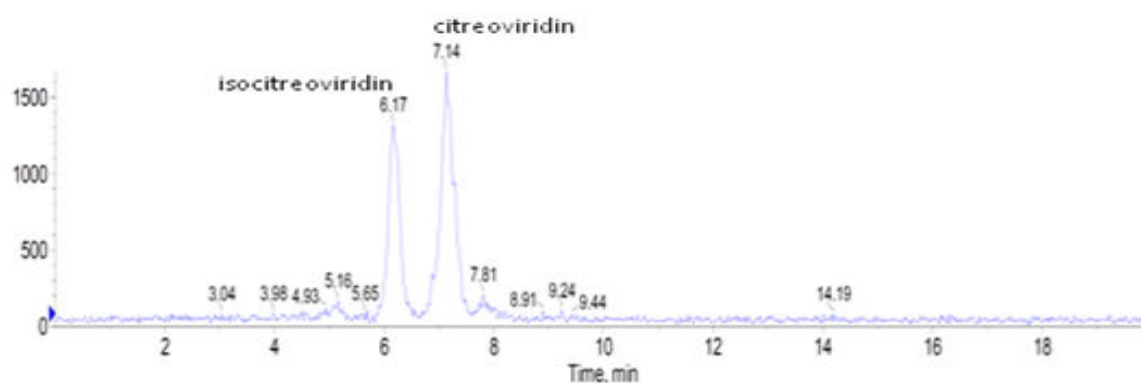


Figure 14. LC-MS/MS chromatogram of fraction 2 stored for about 10 months at -15 °C in amber flask.

Nagel et al. ²⁴ were the first to report the presence of isocitreoviridin in food samples. They also showed that diluted solutions of citreoviridin or isocitreoviridin submitted to diffuse light with a catalytic amount of iodine at room temperature yielded a citreoviridin:isocitreoviridin mixture at a ratio of 7:3. Suh and Wilcox ²⁶ found that up to 40% of citreoviridin is transformed into isocitreoviridin when exposed for 400 minutes to incandescent, fluorescent or natural light. The isomer has also been reported in food samples and in citreoviridin standards by other authors ^{8, 27, 28}. The commercial standard used in this study (97% purity) also showed the presence of a small amount of isocitreoviridin. No E/Z isomerization was observed (citreoviridin → isocitreoviridin) in the purified citreoviridin (Fraction 4) under the storage conditions used in this study (Figure 15).

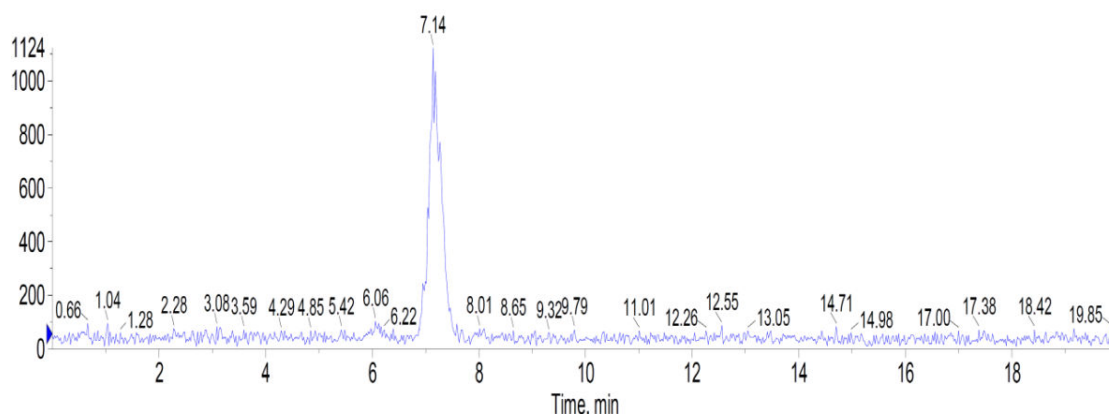


Figure 15. LC-MS/MS chromatogram of purified citreoviridin (Fraction 4) stored for about 10 months at -15 °C in amber flask.

It is important to emphasize that isocitreoviridin seems to have no toxic effect^{10, 24}. Nagel et al²⁴ noted that while citreoviridin is lethal to rats that received 100 mg/kg bw by subcutaneous injection, isocitreoviridin had no effects on the rats. Therefore, the isomerization is a potential source of variability in toxicological studies, showing the importance of purity in the citreoviridin standard utilized in toxicological studies.

The purity of the purified citreoviridin was determined by gravimetric analysis. The weighted mass of a dried 10 mL aliquot of the purified citreoviridin solution was 0.0953 g (n=3, CV of 0.54%). The concentration of citreoviridin in this solution estimated by HPLC was 0.1016 g (n=6; CV of 6.13%). Considering the analytical error of the analytical method, we considered the purified citreoviridin to be 100% pure.

CONCLUSION

In this study a protocol for the production of citreoviridin by *P. citreonigrum* was established. The citreoviridin obtained was purified and its structure fully characterized by state-of-art spectrometric techniques, a work that has not been carried out in the last 20 years for this toxin. About 3 g of pure citreoviridin were obtained in this study, which will allow the conduction of toxicological studies to better elucidate the role of this mycotoxin in the beriberi outbreak that occurred recently in Brazil.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Marta Taniwaki (ITAL, Brazil) for providing the *Penicillium citreonigrum* culture, and Maria Helena Fungaro (UEL, Brazil) for confirming its identity. M. Wagner da Rocha was supported by a master scholarship from the Brazilian Government (CAPES and CNPq).

REFERENCES

- (1) D'Mello, J. P. F. In D'Mello, J. P. F., Ed. CABI Publishing: New York, **2003**; pp 65-90.
- (2) Kuiper-Goodman, T. In *Mycotoxins in food. Detection and control*, Magan, N.; Olsen, M., Eds. CRC Press: New York, **2004**; pp 3-31.
- (3) Ueno, Y. Purchase, I. F. H., Ed. Macmillan: Pretoria, South Africa, 1970; pp 115-132.
- (4) Pitt, J. I.; Hocking, A. D. In *Fungi and food spoilage*, 3ed ed.; Pitt, J. I.; Hocking, A. D., Eds. Springer: New York, **2009**; pp 169-273.
- (5) Pitt, J. I. In *Food spoilage microorganisms*, Blackburn, C. W., Ed. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, **2006**; pp 437-450.
- (6) Thurnham, D. I. In *Guide to nutritional supplements*, Caballero, B., Ed. Elsevier: Oxford, **2009**; pp 381-389.
- (7) Uraguchi, K. *J. Stored Prod. Res.* **1969**, 5 (3), 227-36.
- (8) Linnett, P. E.; Mitchell, A. D.; Osselton, M. D.; Mulheirn, L. J.; Beechey, R. B., *Biochemical Journal* **1978**, 170 (3), 503-510.
- (9) Cataldi de Flombaum, M. A.; Stoppani, A. O. *Mol Biochem Parasitol* **1981**, 3 (3), 143-55.
- (10) Sayood, S. F.; Suh, H.; Wilcox, C. S.; Schuster, S. M. *Arch Biochem Biophys* **1989**, 270 (2), 714-21.
- (11) Datta, S. C.; Ghosh, J. J. *Folia Microbiologica* **1981**, 26 (5).
- (12) Sun, S. Q. *Medical Hypotheses* **2010**, 74 (5), 841-842.
- (13) Yu, J.N.; Wei, C.; Zhang, D.; Pei, J.R.; Li, D.A.; Zhou, L.W.; Feng, H.Q.; Sun, S.Q., *Zhongguo Difangbingxue Zazhi* **2012**, 31 (4), 385-388.
- (14) Wan, Y.; Wang, H.; Yu, J.; Zhang, D.; Pei, J.; Li, D.; Zhang, L.; Sun, S. *Zhongguo Difangbingxue Zazhi* **2011**, 30 (4), 379-383.

- (15) Hong, Y.; Huang, S.; Liu, M. **2010**, 26 (12), 1546-1548.
- (16) Liu, M.; Wang, L.; Lin, L.; Yao, H.; Zhang, F.; Wang, W.; Yang, J. *Zhongguo Gonggong Weisheng* **2007**, 23 (5), 565-567.
- (17) Padilha, E. M.; Fujimori, E.; Borges, A. L. V.; Sato, A. P. S.; Gomes, M. N.; Branco, M. d. R. F. C.; Santos, H. J. d.; Lermen Junior, N. *Cadernos de Saúde Pública* **2011**, 27, 449-459.
- (18) Rosa, C. A. R.; Keller, K. M.; Oliveira, A. A.; Almeida, T. X.; Keller, L. A. M.; Marassi, A. C.; Kruger, C. D.; Deveza, M. V.; Monteiro, B. S.; Nunes, L. M. T.; Astoreca, A.; Cavaglieri, L. R.; Direito, G. M.; Eifert, E. C.; Lima, T. A. S.; Modernell, K. G.; Nunes, F. I. B.; Garcia, A. M.; Luz, M. S.; Oliveira, D. C. N. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* **2010**, 27 (2).
- (19) Alves Vieira Lima, H. C.; Santana Porto, E. A.; Pio Marins, J. R.; Alves, R. M.; Machado, R. R.; Laranjeira Braga, K. N.; de Paiva, F. B.; Ikeda Carmo, G. M.; Faria Silva e Santelli, A. C.; Sobel, J. *Tropical Doctor* **2010**, 40 (2).
- (20) Singh, K.; Frisvad, J. C.; Thrane, U.; Mathur, S. B. In *An Illustrated Manual on Identification of some seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their mycotoxins*, Singh, K.; Frisvad, J. C.; Thrane, U.; Mathur, S. B., Eds. Danish Government Institute of Seed Pathology: Denmark, **1991**; pp 12-29.
- (21) Barberis, C. L.; Dalcero, A. M.; Magnoli, C. E. *Mycotoxin Res.* **2012**, 28 (3), 149-156.
- (22) Steyn, P. S.; Vleggaar, R.; Wessels, P. L.; Woudenberg, M. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1982**, (9), 2175-2178.
- (23) Cole, R. J.; Dorner, J. W.; Cox, R. H.; Hill, R. A.; Cluter, H. G.; Wells, J. M. *Applied and Environmental Microbiology* **1981**, 42 (4), 677-681.
- (24) Nagel, D. W.; Steyn, P. S.; Scott, D. B. *Phytochemistry* **1972**, 11 (2), 627-630.
- (25) Nielsen, K. F.; Smedsgaard, J. *J. Chromatogr., A* **2003**, 1002 (1-2), 111-136.
- (26) Suh, H. S.; Wilcox, C. S. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, 110 (2), 470-481.
- (27) Suh, H. S.; Huh, H. K.; Wilcox, C. S. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **1996**, 17 (2), 104-105.
- (28) Stubblefield, R. D.; Greer, J. I.; Shotwell, O. L. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **1988**, 71 (4), 721-724.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo foram estabelecidos os protocolos de produção de citreoviridina pelo fungo *Penicillium citreonigrum* em meio de cultura YES e de purificação da toxina por HPLC semi-preparativa. Este foi o primeiro estudo que utilizou esta técnica no processo de purificação da citreoviridina, o que proporcionou a obtenção da toxina com alto grau de pureza (100%). Estudos anteriores utilizaram principalmente cromatografia em coluna, e não reportaram o teor do produto obtido. A purificação, além de reduzir impurezas, também proporcionou a separação do seu isômero, isocitreoviridina.

A citreoviridina purificada foi caracterizada por técnicas *state-of-art* disponíveis atualmente, UV/Vis, IV, ^1H e ^{13}C -RMN, LC-MS/TOF e LC-MS/MS. Além de confirmar sua identidade e pureza, esta caracterização proporcionou um maior conhecimento sobre a molécula e suas propriedades físico-químicas. A citreoviridina purificada obtida neste trabalho (3,25 g) será utilizada para conduzir estudos toxicológicos em animais.

O beribéri é uma doença de baixa incidência atualmente e que tem ocorrido esporadicamente em algumas regiões do mundo, principalmente onde há insegurança alimentar e o consumo de alimento de baixa qualidade. Desta maneira, poucos grupos no mundo se prestam a conduzir estudos que possibilitem a elucidação das causas da doença, principalmente quando a hipótese de carência nutricional pode ser descartada. Os estudos toxicológicos com citreoviridina serão feitos com ratos, via oral, e terão como objetivo principal estabelecer uma dose que represente uma exposição segura para o homem, a Ingestão Diária Aceitável. Esta dose ainda não foi estabelecida e é uma demanda da Gerência de Alimentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Com esta informação será possível avaliar se o consumo de arroz contendo citreoviridina por populações de áreas críticas, como o Maranhão, pode representar um risco à saúde.

REFERÊNCIAS

- Almeida MI, Almeida NG, Carvalho KL, Gonçalves GAA, Silva CN, Santos EA, et al. Co-occurrence of aflatoxins B1 , B2 , G1 and G2 , ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. Food Additives & Contaminants Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment. 2012;29(4):694-703.
- Aziz NH, Mattar ZA, Mahrous SR. Contamination of grains by mycotoxin-producing molds and mycotoxins and control by gamma irradiation. Journal of Food Safety. 2006;26(3):184-201.
- Beechey RB, Osselton DO, Baum H, Linnett PE, Mitchell AD, editors. Citreoviridin diacetate, a new inhibitor of the mitochondrial ATP-synthetase. Membr. Proteins Transp. Phosphorylation, Proc. Int. Symposium 1974: North Holland.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 da ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União – D.O.U., de 22 de fevereiro de 2011.
- Brera C, De Santis B, Debegnach F, Miraglia M. Mycotoxins. In: Picó Y, editor. Comprehensive analytical chemistry food contaminants and residue analysis. 51. Amsterdam: Elsevier; 2008. p. 364-427.
- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiol Mol Biol Rev. 2002;66(3):447-59.
- Christensen M, Frisvad JC, Tuthill D. Taxonomy of the *Penicillium miczynskii* group based on morphology and secondary metabolites. Mycological Research. 1999;103(5):527-41.
- Chung IM, Kim EY, Paik SB, Yu SH. Detection of major mycotoxins from contaminated cereals (wheat, soybean and corn). Anal Sci Technol. 1999;12(6):534-9.
- Codex Alimentarius. Prevention and Reduction of Food and Feed Contamination; 2012. [Internet]. [Acessado em: 12 de março de 2013]. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/Booklets/Contaminants/CCCF_2012_EN.pdf

- Cole RJ, Dorner JW, Cox RH, Hill RA, Cluter HG, Wells JM. Isolation of citreoviridin from *Penicillium-charlesii* cultures and molded pecan fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 1981;42(4):677-81.
- Costa, CCC. Construindo estruturas químicas de substâncias desconhecidas: uma proposta de material paradidática [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília, Instituto de Física, Instituto de Química, Instituto de Biologia, 2010.
- Dass C. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. New Jersey: Wiley-Interscience; 2007. 585 p.
- Datta SC, Ghosh JJ. Production and purification of *Penicillium-citreoviride* toxin and its effect on TPP-dependent liver transketolase. *Folia Microbiologica*. 1981;26(5).
- Datta SC, Ghosh JJ. Action of citreoviridin, a mycotoxin from *Penicillium citreo-viride*, on macromolecular compositions of rat brain and liver. *J Environ Biol*. 1982;3(4):155-63.
- Datta SC, Ghosh JJ. Action of citreoviridin, a mycotoxin from *Penicillium citreoviride*, on the gamma-aminobutyric acid metabolism of the central nervous system. *Toxicon*. 1983;Suppl. 3:89-92.
- D'Mello JPF. Mycotoxins in cereal grains, nuts and other plant products In: D'Mello JPF, editor. *Food safety: contaminants and toxins*. New York: CABI Publishing; 2003. p. 65-90.
- Egmond HP, Jonker MA. Current regulations governing mycotoxin limits in food. In: Magan N, Olsen M, editors. *Mycotoxins in food Detection and control*. New York: CRC Press; 2004. p. 49-68.
- Fattal-Valevski A. Thiamine (vitamin B1). *J Evidence-Based Complementary Altern Med*. 2011;16(1):12-20.
- Food and Agricultural Organization; World Health Organization (FAO/WHO). Manual on the application of the HACCP system in Mycotoxin prevention and control [Internet]. Rome: 2001. [Acessado em 20 de janeiro de 2013]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/y1390e/y1390e00.htm>
- Food and Agricultural Organization; World Health Organization (FAO/WHO). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003 [Internet]. Rome: 2004. [Acessado em 20 de janeiro de 2013]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.HTM>

- Frisvad JC, Thrane U, Samson RA. Mycotoxin producers. In: Dijksterhuis J, Samson RA, editors. Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food. Mycology Series. 25. New York: CRC Press; 2007. p. 135-59.
- Gause EM, Buck MA, Douglas MG. Binding of citreoviridin to the β subunit of the yeast F1-ATPase. J Biol Chem. 1981;256(2):557-9.
- Graves RR, Hesseltine CW. Fungi in flour and refrigerated dough products. Mycopathol Mycol Appl. 1966;29(3):277-90.
- Griffiths-Jones CM, Knight DW. A total synthesis of ($\pm$)- α -cyclopiazonic acid using a cationic cascade as a key step. Tetrahedron. 2011;67(44):8515-28.
- Hong Y, Huang S, Liu M. Biosynthesis of CIT and damage of myocardial structure and function induced by CIT in rats. Zhongguo Gonggong Weisheng. 2010;26(12):1546-8.
- Hou H, Li C, Li Q, Li D, Ye W, Jiao P. Effects of apoptosis and DNA damage on human umbilical vein endothelial cells induced by citreoviridin. Zhongguo Yufang Yixue Zazhi. 2011;12(4):311-3.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009. Dados Brutos. Rio de Janeiro: IBGE; 2011.
- International Agency of Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon: IARC Press; 2002. v. 82. 601 p.
- Jacobsen NE. NMR Spectroscopy Explained. Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology. New Jersey: Wiley; 2007. 640 p.
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Mycotoxins. In: Jay JM, Loessner MJ, Golden DA, editors. Modern food microbiology. 7 ed. New York: Springer; 2005. p. 709-26.
- Ji Y, Zhu K, Qian H, Zhou H. Effect of water activity and temperature on growth of *Penicillium citreoviride* and *Penicillium citrinum* on MiGao (rice cake). Can J Microbiol. 2007;53(2):231-6.
- Kabak B. Prevention and management of mycotoxins in food and feed. In: Rai M, Varma A, editors. Mycotoxins in food, feed and bioweapons. New York: Springer; 2010. p. 201-27.
- Kalsi PS. Spectroscopy of organic compounds. New Delhi: New Age International Publishers; 2004.
- Keeler J. Understanding NMR Spectroscopy. Cambridge: Wiley; 2011. 526 p.

- Keller LAM. Toxinas em arroz na agricultura familiar do Estado do Maranhão e seus efeitos tóxicos nos consumidores. In: XIV Encontro Nacional de Micotoxinas; 2010. Florianópolis.
- Kuiper-Goodman T. Risk assessment and risk management of mycotoxins in food. In: Magan N, Olsen M, editors. Mycotoxins in food Detection and control. New York: CRC Press; 2004. p. 3-31.
- Kure CF, Skaar I, Brendehaug J. Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;93(1):41-9.
- Lamondlab. Electrospray Ionisation [Internet]. Dundee, 2013a. [Acesso em: 2013-02-20]. Disponível em: <http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayionisation.php>.
- Lamondlab. MS/MS Modes [Internet]. Dundee, 2013a. [Acesso em: 2013-02-20]. Disponível em: <http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/MSMSOverview.php>.
- Larkin PJ. IR and Raman Spectroscopy - Principles and spectral interpretation. Waltham: Elsevier; 2011.
- Lima HCAV, Porto EAS, Marins JRP, Alves RM, Machado RR, Braga KNL, et al. Outbreak of beriberi in the state of Maranhao, Brazil: revisiting the mycotoxin aetiologic hypothesis. *Tropical Doctor*. 2010;40(2).
- Linnett PE, Mitchell AD, Osselton MD, Mulheirn LJ, Beechey RB. Citreoviridin, a specific inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase. *Biochem J*. 1978;170(3):503-10.
- Liu L, Li D, Feng J, Wang S, Xu W, Zhu D. Detection of citreoviridin in crops by thin-layer chromatography. *Zhongguo Difangbingxue Zazhi*. 2007;26(6):691-2.
- Liu M, Jiang X, Yao H. Injury of myocardial cells induced by citreoviridin. *Zhonghua Laodong Weisheng Zhiyebing Zazhi*. 2006;24(3):177-8.
- Liu M, Wang L, Lin L, Yao H, Zhang F, Wang W, et al. Observation on CIT-induced cardiotoxicity. *Zhongguo Gonggong Weisheng*. 2007;23(5):565-7.
- Magan N, Aldred D. Why do fungi produce mycotoxins? In: Dijksterhuis J, Samson RA, editors. Food mycology A multifaceted approach to fungi and food. Mycology Series. 25. New York: CRC Press; 2007. p. 121-33.

- Marcelli A, Cricenti A, Kwiatak WM, Petibois C. Biological applications of synchrotron radiation infrared spectromicroscopy. *Biotechnology Advances*. 2012;30(6):1390-404.
- Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Atenção à Saúde, Secretaria Especial de Saúde indígena, Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Consulta para Vigilância Epidemiológica, Assistência e Atenção Nutricional dos Casos de Beribéri. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- Michigan State University. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy [Internet]. Michigan, 2013. [Acesso em: 2013-02-20]. Disponível em: <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/nmr/nmr1.htm>.
- Morrissey RE, Vesonder RF. Teratogenic potential of the mycotoxin, citreoviridin, in rats. *Food Chem Toxicol*. 1986;24(12):1315-20.
- Moss MO. Mycotoxins. *Mycol Res*. 1996;100(5):513-23
- Nagel DW, Scott DB, Steyn PS. Production of citreoviridin by *Penicillium pulvillorum*. *Phytochemistry*. 1972;11(2):627-30.
- Nayler P, Whiting MC. Polyenes. III. Synthesis and light absorption of dimethylpolyenes. *J Chem Soc*. 1955:3037-47.
- Nelson DL, Cox MM. Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. In: Nelson DL, Cox MM, editors. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W. H. Freeman; 2004. p. 521-59.
- Nesci A, Barros G, Castillo C, Etcheverry M. Soil fungal population in preharvest maize ecosystem in different tillage practices in Argentina. *Soil and Tillage Research*. 2006;91(1-2):143-9.
- Nicholson P. Rapid detection of mycotoxigenic fungi in plants. In: Magan N, Olsen M, editors. *Mycotoxins in food Detection and control*. New York: CRC Press; 2004. p. 111-36.
- Nishie K, Cole RJ, Dorner JW. Toxicity of citreoviridin. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1988;59(1):31-52.
- Njobeh PB, Dutton MF, Koch SH, Chuturgoon A, Stoev S, Seifert K. Contamination with storage fungi of human food from Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;135(3):193-8.

- Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Guias para o gerenciamento dos riscos sanitários em alimentos. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2009.
- Padilha, EM. Perfil epidemiológico do beribéri notificado de 2006 a 2008 no estado do Maranhão, Brasil e as ações de enfrentamento [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Escola de Enfermagem; 2010 [acesso 2013-02-06]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/7/7141/tde-13072010-081806/>.
- Padilha EM, Fujimori E, Borges ALV, Sato APS, Gomes MN, Branco MRFC, et al. Perfil epidemiológico do beribéri notificado de 2006 a 2008 no Estado do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2011;27:449-59.
- Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introdução à Espectroscopia. São Paulo: Cengage Learning; 2012. 700 p.
- Pitt JI. *Penicillium* and related genera. In: Blackburn CW, editor. Food spoilage microorganisms. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2006. p. 437-50.
- Pitt JI, Hocking AD. *Penicillium* and related genera. In: Pitt JI, Hocking AD, editors. Fungi and food spoilage. 3ed ed. New York: Springer; 2009a. p. 169-273.
- Pitt JI, Hocking AD. The ecology of fungal food spoilage. In: Pitt JI, Hocking AD, editors. Fungi and food spoilage. 3 ed. New York: Springer; 2009b. p. 3-9.
- Pitt JI, Hocking AD, Bhudhasamai K, Miscamble BF, Wheeler KA, Tanboon-Ek P. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology*. 1994;23(1):35-53.
- Portugal, PJSC. Radiações eletromagnéticas [Internet]. Coimbra, 2007 [Acesso em: 2013-02-20] Disponível em: <http://profs.ccems.pt/PauloPortugal/CHYMICA/REM/REM.html>.
- Romero SM, Comerio RM, Larumbe G, Ritieni A, Vaamonde G, Fernández Pinto V. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 2005;104(1):43-9.
- Rosa CAR, Keller KM, Oliveira AA, Almeida TX, Keller LAM, Marassi AC, et al. Production of citreoviridin by *Penicillium citreonigrum* strains associated with rice consumption and beriberi cases in the Maranhao State, Brazil. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*. 2010;27(2).

- Sakabe N, Goto T, Hirata Y. The structure of citreoviridin, a toxic compound produced by *P. citreoviride* molded on rice. *Tetrahedron Letters*. 1964;5(27):1825-30.
- Sakabe N, Goto T, Hirata Y. Structure of citreoviridin, a mycotoxin produced by *Penicillium citreo-viride* molded on rice. *Tetrahedron*. 1977;33(23):3077-81.
- Satre M, Bof M, Vignais PV. Interaction of *Escherichia coli* adenosine triphosphatase with aurovertin and citreoviridin: inhibition and fluorescence studies. *J Bacteriol*. 1980;142(3):768-76.
- Sayood SF, Suh H, Wilcox CS, Schuster SM. Effect of citreoviridin and isocitreoviridin on beef heart mitochondrial ATPase. *Arch Biochem Biophys*. 1989;270(2):714-21.
- Serra R, Peterson S, Venancio A, Ctcorc. Multilocus sequence identification of *Penicillium* species in cork bark during plank preparation for the manufacture of stoppers. *Research in Microbiology*. 2008;159(3).
- Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7a ed. Rio de Janeiro: LTC; 2010. 490 p.
- Stubblefield RD, Greer JI, Shotwell OL. Liquid-chromatographic method for determination of citreoviridin in corn and rice. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 1988;71(4):721-4.
- Suh HS, Huh HK, Wilcox CS. Chemistry of F-1,F-0-ATPase inhibitor. Photoisomerization of citreoviridin and isocitreoviridin and structure of isocitreoviridin. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 1996;17(2):104-5.
- Suh HS, Wilcox CS. Chemistry of F1,F0-ATPase inhibitors - stereoselective total syntheses of (+)-citreoviridin and (-)-citreoviridin. *Journal of the American Chemical Society*. 1988;110(2):470-81.
- Sullivan EV, Fama R. Wernicke's Encephalopathy and Korsakoff's Syndrome Revisited. *Neuropsychology Review*. 2012;22(2):69-71.
- Sun SQ. Chronic exposure to cereal mycotoxin likely citreoviridin may be a trigger for Keshan disease mainly through oxidative stress mechanism. *Medical Hypotheses*. 2010;74(5):841-2.
- Tangni EK, Pussemier L. Ergosterol and mycotoxins in grain dusts from fourteen Belgian cereal storages: a preliminary screening survey. *J Sci Food Agric*. 2007;87(7):1263-70.

- Thurnham DI. Thiamin/Beriberi. In: Caballero B, editor. Guide to nutritional supplements. Oxford: Elsevier; 2009. p. 381-9.
- Ueno Y. Production of citreoviridin, a neurotoxic mycotoxin of *Penicillium citreo-viride* Biouge. In: Purchase IFH, editor. Symposium on Mycotoxins in Human Health; Pretoria, South Africa: Macmillan; 1970. p. 115-32.
- Ueno Y, Ueno I. Isolation and acute toxicity of citreoviridin, a neurotoxic mycotoxin of *Penicillium citreo-viride* biourge. Japanese Journal of Experimental Medicine. 1972;42(2).
- Uraguchi K. Mycotoxic origin of cardiac beriberi. J Stored Prod Res. 1969;5(3):227-36.
- Warth B, Parich A, Atehnkeng J, Bandyopadhyay R, Schuhmacher R, Sulyok M, et al. Quantitation of Mycotoxins in Food and Feed from Burkina Faso and Mozambique Using a Modern LC-MS/MS Multitoxin Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012;60(36):9352-63.
- Wicklow DT, Cole RJ. Citreoviridin in standing corn infested by *Eupenicillium ochrosalmoneum*. Mycologia. 1984;76(5).
- Wicklow DT, Stubblefield RD, Horn BW, Shotwell OL. Citreoviridin levels in *Eupenicillium ochrosalmoneum*-infested maize kernels at harvest. Applied and Environmental Microbiology. 1988;54(5).
- Xavier, J. M. M. (2010). Treinamento Plataforma 4000QTRAP®. A. B. Company. *apud* Zancanaro, I. Análise de substâncias psicoativas em fluido oral de condutores brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2012.
- Yadav LDS. Organic Spectroscopy. New Delhi: Kluwer Academic Publishers; 2005.

APÊNDICE A – RMN BIDIMENSIONAL

Espectro de RMN bidimensional da citreoviridina purificada. (a) Espectroscopia de correlação COSY (Correlation Spectroscopy) mostrando as correlações homonucleares entre ^1H - ^1H ; (b) Correlação Heteronuclear Múltiplo-Quântica (HMQC) com as correlações diretas entre ^1H - ^{13}C ; (c) Correlação Heteronuclear através de Muitas Ligações (HMBC) apresentando as correlações ^1H - ^{13}C para núcleos de carbono com mais de duas ligações com núcleos hidrogênio.

