

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências da Saúde

Ângela Cristina Stelmo da Silva

**FUMONISINAS EM PRODUTOS DE MILHO: METODOLOGIA, ANÁLISE E
AVALIAÇÃO DE RISCO**

Dissertação de Mestrado

Brasília - DF

2005

FUMONISINAS EM PRODUTOS DE MILHO: METODOLOGIA, ANÁLISE E AVALIAÇÃO DE RISCO

Ângela Cristina Stelmo da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em. **Ciências da Saúde.**

Orientadora: Profa. Dra. Eloísa Dutra Caldas.

Brasília - DF
2005

Ângela Cristina Stelmo da Silva

**FUMONISINAS EM PRODUTOS DE MILHO: METODOLOGIA, ANÁLISE E
AVALIAÇÃO DE RISCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília em 08 de abril de 2005, orientada pela Profa. Dra. Eloísa Dutra Caldas.

Profa. Dra. Eloísa Dutra Caldas (Orientadora) - UnB

Profa. Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira - UnB

Profa. Dra. Maria Irismar Nepomuceno Ximenes – Convidada

AGRADECIMENTOS

A Marcelo, que esteve sempre ao meu lado, mesmo nos momentos em que eu não pude estar presente, e principalmente nos preparativos para a recepção de nossa filha Helena;

Aos meus pais que contribuíram para a formação do indivíduo, profissional e estudante que sou hoje, e que sempre me incentivaram em todo projeto de crescimento;

À minha família e aos amigos, pelo incentivo e carinho, apoio científico e moral, e acolhimento nas horas de esgotamento físico e mental;

À orientadora Eloísa que foi além da dedicação que seu papel exige;

Aos colegas e professores de mestrado que compartilharam seus conhecimentos e precioso tempo de diferentes maneiras;

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF), que disponibilizou suas instalações e equipamentos;

Aos colegas do NVMAC/LACEN-DF que me receberam de braços abertos possibilitando a execução deste trabalho;

A Diretoria de Vigilância Sanitária – DF (DIVISA – DF), que disponibilizou amostras para este trabalho de pesquisa.

“Este trabalho foi realizado com ajuda da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”.

RESUMO

Este trabalho avaliou o risco a que está submetida a população do Distrito Federal pelo consumo de produtos derivados de milho contaminados por fumonisinas. Foram determinadas as concentrações de fumonisinas FB₁ e FB₂ em 10 produtos de milho, num total de 207 amostras comercializadas na região do Distrito Federal. A contaminação das amostras foi quantificada por HPLC/fluorescência, a partir de metodologia com quatro variações no preparo das amostras validada e operacionalizada nas instalações do Laboratório de Micotoxinas do LACEN-DF. Os produtos avaliados, cornflakes, creme de milho, farinha de milho, flocos de milho, fubá, pipoca, snacks; milho verde congelado, milho verde enlatado e milho verde *in natura* apresentaram contaminação média de amostras positivas que variou de $0,316 \pm 0,160$ a $2,045 \pm 0,796$ mg.kg⁻¹ de produto. Os produtos que apresentaram maior incidência de contaminação foram o fubá, o creme de milho, flocos de milho e farinha de milho. Somente em amostras de milho verde *in natura* não foi detectada presença de fumonisinas na totalidade de amostras analisadas. A provável ingestão diária de fumonisinas avaliada neste estudo com base no consumo estimado dos produtos de milho pela população do Distrito Federal não apresentou valores superiores ao limite de tolerância recomendado pela Organização Mundial de Saúde, embora as contaminações encontradas nestes produtos tenham se apresentado similares às de regiões de alta incidência de câncer de esôfago no mundo.

Palavras-chave: Fumonisinas; Validação de Metodologia; Ingestão Diária.

ABSTRACT

This work evaluated the risk that the population of the Federal District is submitted from the consumption of corn-based products contaminated by fumonisins. The concentrations of fumonisinas FB1 and FB2 in 207 samples of 10 different maize products comercialized in the Federal District were determined. Methodologie for analisis of these products by HPLC/fluorescence were validated at LACEN-DF Laboratory of Micotoxins. The products evaluated, cornflakes, maize flour, pre-cooked corn meal, pre-cooked corn in flakes, corn meal, popcorn, snacks; congealed sweet maize, canned maize and sweet corn had an average contamination of positive samples ranging from $0,316\pm 0,160$ to $2,045\pm 0,796$ mg.kg⁻¹ of product. The products with greater contamination incidence was corn meal, maize flour, pre-cooked corn in flakes and pre-cooked corn meal. Fumonisins were not detected in any sweet corn samples analysed. The probable daily ingestion of fumonisins through the consumption of maize products by population from Federal District did not exceeded the tolerance levels recommended by the World Health Organization. However, the fumonisin levels found in this study was similar to those found in regions of high incidence of cancer of esophagus in the world.

Word-key: Fumonisins; Methodology Validation; Daily ingestion.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – POSSÍVEIS VIAS DE CONTAMINAÇÃO NO CICLO DA DOENÇA DO FUSARIUM NO MILHO (MUNKVOLD ET AL., 1997).	6
FIGURA 2 – MORFOLOGIA DO GRÃO DE MILHO.....	10
FIGURA 3 – PROCESSO DE INDUSTRIALIZAÇÃO DO MILHO (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS MOAGEIRAS DE MILHO, 2003).	13
FIGURA 4 – FLUXOGRAMAS DE PRODUÇÃO DE CORNFLAKES E SNACKS.	14
FIGURA 5 - ALGUMAS MICOTOXINAS, RESPECTIVOS FUNGOS PRODUTORES E ALIMENTOS NOS QUAIS SÃO ENCONTRADAS (CONCON (1988) APUD MIDIO ET AL., 2000; PITTET (1998) APUD MIDIO ET AL., 2000).	15
FIGURA 6 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS FUMONISINAS FB ₁ , FB ₂ E FB ₃	16
FIGURA 7 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS FUMONISINAS ANÁLOGAS	17
FIGURA 8 – CROMATOGRAMA EM HPLC DE AMOSTRA DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADA COM FUMONISINAS DOS GRUPOS B E C.	18
FIGURA 9 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DA ESFINGOSINA E DAS FUMONISINAS FB ₁ E FB ₂ (WANG ET AL., 1991).	22
FIGURA 10 – CICLO DE BIOSÍNTESE DAS BASES ESFINGÓIDES (MERRILL JR.,2002)	23
FIGURA 11 – APRESENTAÇÃO TÍPICA DAS COLUNAS SPE E AS PRINCIPAIS ETAPAS EMPREGADAS PARA ISOLAMENTO DO ANALITO (LANÇAS, 2004).	38
FIGURA 12 – ESTRUTURAS LIGADAS A SILICA NOS DIFERENTES TIPOS DE COLUNA SPE..	38
FIGURA 13 – ESQUEMA BÁSICO DE UM EQUIPAMENTO (SKOOG ET AL., 2002).	40
FIGURA 14 – POLARIDADE DOS SOLVENTES (CIOLA, 1998).	42
FIGURA 15 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DA REAÇÃO DO OPA COM 2-MERCAPTOETANOL (RSH) E H ₂ NR' (AMINOÁCIDOS OU FUMONISINAS) PARA DETECÇÃO POR HPLC / FLUORESCÊNCIA (DORRESTEIJN ET AL., 1996).....	44
FIGURA 16 – REAÇÃO DA AMINA PRIMÁRIA DA FB ₁ COM DICARBOXIALDEIDO NAFTALENO (NDA) NA PRESENÇA DE ÍONS CIANETO (CN ⁻) FORMANDO UM DERIVADO ESTÁVEL (BENNETT ET AL., 1994).....	44
FIGURA 17 –AMOSTRA DE MILHO CONGELADO NÃO ENRIQUECIDA UTILIZANDO SAX PARA CLEAN UP E DERIVAÇÃO COM NDA (A) E OPA (B). SÃO REPRESENTADOS EM LINHAS MAIS ESTREITAS CROMATOGRAMAS DOS REAGENTES (BRANCO) E DO PADRÃO FB ₁ PURO RESPECTIVAMENTE. TEMPO DE RETENÇÃO DO PADRÃO FB ₁ : 7,9 MINUTOS.	65
FIGURA 18 – AMOSTRA DE MILHO CONGELADO NÃO ENRIQUECIDA UTILIZANDO SAX + C18 PARA CLEAN UP E DERIVAÇÃO COM NDA (A) OPA (B). SÃO REPRESENTADOS EM LINHAS MAIS ESTREITAS CROMATOGRAMAS DOS REAGENTES (BRANCO) E DO PADRÃO RESPECTIVAMENTE. TEMPO DE RETENÇÃO DO PADRÃO FB ₁ : 7,9 MINUTOS.	66
FIGURA 19 – CROMATOGRAMA DA FB ₁ : DERIVADA COM NDA. EM LINHA MAIS ESTREITA O CROMATOGRAMA DOS REAGENTES (BRANCO). CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL INJETADO: PADRÃO FB ₁ EM 0,25 NG/μL (TEMPO DE RETENÇÃO: 7,4 MINUTOS)	75
FIGURA 20 – CROMATOGRAMA DA FB ₁ : DERIVADA COM OPA. EM LINHA MAIS ESTREITA O CROMATOGRAMA DOS REAGENTES (BRANCO). CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL INJETADO: PADRÃO FB ₁ EM 0,4 NG/μL (TEMPO DE RETENÇÃO: 8 MINUTOS).	76
FIGURA 21 – CROMATOGRAMAS DAS FUMONISINAS B ₁ E B ₂ : RESPOSTA DO MESMO CONTROLE DO PADRÃO EM PERÍODO SUPERIOR A 24 HORAS DE DERIVAÇÃO (A). PRIMEIRO DIA, 18 DIAS APÓS DERIVAÇÃO (B) E 30 DIAS APÓS DERIVAÇÃO (C).....	83
FIGURA 22 – CURVA PADRÃO FB ₁ (DIREITA) E CURVA PADRÃO FB ₂ (ESQUERDA).	84

FIGURA 23 – CROMATOGRAMA DAS FUMONISINAS FB ₁ E FB ₂ DERIVATIZADAS COM NDA E NAS CONDIÇÕES DE TRABALHO DESCRITAS PARA O HPLC.....	85
FIGURA 24 – CROMATOGRAMA DE AMOSTRA DE FLOCOS DE MILHO COM CONTAMINAÇÃO DE 1,6 MG/KG (FB ₁ + FB ₂).	86
FIGURA 25 – ANÁLISE DE AMOSTRA DE FARINHA DE MILHO NAS CONDIÇÕES DO HPLC DEFINIDAS PARA OS OUTROS PRODUTOS (A) E SOB NOVAS CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA ESPECIALMENTE PARA O PRODUTO (B).	87
FIGURA 26 – FLUXOGRAMA RESUMIDO DAS METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS FB ₁ E FB ₂ VALIDADAS PARA OS PRODUTOS A BASE DE MILHO ANALISADOS.....	89
FIGURA 27 – FREQUÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO POR PRODUTO: AMOSTRAS CONTAMINADAS POR AMOSTRAS ANALISADAS.....	93
FIGURA 28 – MÉDIAS E MEDIANAS DAS CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS NAS AMOSTRAS (MG.KG ⁻¹).	93
FIGURA 29 – GRÁFICO DAS CONCENTRAÇÕES MÁXIMAS DE FUMONISINAS ENCONTRADAS NOS PRODUTOS DE MILHO ANALISADOS (MG.KG ⁻¹).	94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS EM ÁREAS DE CÂNCER DE ESÔFAGO EM TRANSKEI, ÁFRICA DO SUL.....	28
TABELA 2.1 – CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS ENCONTRADAS EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO DESTINADOS A ALIMENTAÇÃO HUMANA NO MUNDO.	30
TABELA 2.2 – CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS ENCONTRADAS EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO DESTINADOS A ALIMENTAÇÃO HUMANA NO MUNDO.	31
TABELA 3 – CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS EM MILHO DAS SAFRAS 1990-1991 NO ESTADO DO PARANÁ.....	32
TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS ENCONTRADAS EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO DESTINADOS A ALIMENTAÇÃO HUMANA NO BRASIL.....	34
TABELA 5.1 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: EXTRAÇÃO, CLEAN UP, DERIVAÇÃO E CONDIÇÕES DE TRABALHO DO HPLC.	45
TABELA 5.2 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: EXTRAÇÃO, CLEAN UP, DERIVAÇÃO E CONDIÇÕES DE TRABALHO DO HPLC.	46
TABELA 5.3 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: EXTRAÇÃO, CLEAN UP, DERIVAÇÃO E CONDIÇÕES DE TRABALHO DO HPLC.	47
TABELA 6.1 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: CLEAN UP, DERIVAÇÃO E DILUIÇÃO DA AMOSTRA INJETADA NO HPLC.	48
TABELA 6.2 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: CLEAN UP, DERIVAÇÃO E DILUIÇÃO DA AMOSTRA INJETADA NO HPLC.	49
TABELA 6.3 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: CLEAN UP, DERIVAÇÃO E DILUIÇÃO DA AMOSTRA INJETADA NO HPLC.	50

TABELA 6.4 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: CLEAN UP, DERIVAÇÃO E DILUIÇÃO DA AMOSTRA INJETADA NO HPLC.	51
TABELA 7.1 - TESTES DE RECUPERAÇÃO DA FASE DE CLEAN UP A PARTIR DE EXTRATOS EM ACETONITRILA-ÁGUA	70
TABELA 7.2 - TESTES DE RECUPERAÇÃO DA FASE DE CLEAN UP A PARTIR DE EXTRATOS EM ACETONITRILA-ÁGUA	71
TABELA 8 – COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MARCAS DE COLUNA A PARTIR DE EXTRATOS EM ACETONITRILA-ÁGUA DE AMOSTRAS NATURALMENTE CONTAMINADAS	72
TABELA 9 – COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA COLUNA SAX A PARTIR DE SOLVENTE+FUMONISINAS, EXTRATO EM ACETONITRILA-ÁGUA DE AMOSTRA NATURALMENTE CONTAMINADA E EXTRATO EM ACETONITRILA-ÁGUA DE AMOSTRA NATURALMENTE CONTAMINADA+FUMONISINAS.....	73
TABELA 10 – CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PARA DIFERENTES TIPOS DE AMOSTRA	80
TABELA 11 - COMPARAÇÃO DE RECUPERAÇÃO E REPRODUTIBILIDADE ENTRE DIFERENTES MARCAS DE COLUNA SPE SAX.....	82
TABELA 12 – VALORES DE RECUPERAÇÃO NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS FB1 E FB2 PARA MILHO DE PIPOCA, FUBÁ, SNACKS, CORNFLAKES E MILHO ENLATADO E RESPECTIVOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO.....	90
TABELA 13 – CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS ENCONTRADAS EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO CONSUMIDOS NO DISTRITO FEDERAL: INTERVALOS DE CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS, VALOR MÉDIO DAS CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS CONTAMINADAS (POSITIVAS), VALOR MÉDIO DAS CONCENTRAÇÕES, MEDIANA DAS CONCENTRAÇÕES.	92
TABELA 14 – COMPARAÇÃO ENTRE CONTAMINAÇÕES ENCONTRADAS NO DF COM CONTAMINAÇÕES DE OUTRAS LOCALIDADES BRASILEIRAS	98
TABELA 15 – COMPARAÇÃO ENTRE CONTAMINAÇÕES ENCONTRADAS NO DF COM CONTAMINAÇÕES ENCONTRADAS EM PAÍSES COM CORRELAÇÃO POSITIVA ENTRE FUMONISINAS E CANCER DE ESÔFAGO	99
TABELA 16 – CONSUMO DE PRODUTOS A BASE DE MILHO (IBGE, 2004).....	101
TABELA 17 – INGESTÃO DIÁRIA DE FUMONISINAS NO DISTRITO FEDERAL COM BASE NA CONTAMINAÇÃO ENCONTRADA EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO.	103
TABELA 18 – INGESTÃO DIÁRIA DE FUMONISINAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE COM BASE NA CONTAMINAÇÃO ENCONTRADA EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO.	104
TABELA 19 – INGESTÃO DIÁRIA INFANTIL DE FUMONISINAS NO DISTRITO FEDERAL COM BASE NA CONTAMINAÇÃO ENCONTRADA EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO.	105
TABELA 20 – INGESTÃO DIÁRIA DE FUMONISINAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE POR RENDA FAMILIAR MENSAL COM BASE NA CONTAMINAÇÃO ENCONTRADA EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO.....	107
TABELA 21 –CONSUMO PER CAPITA DE PRODUTOS A BASE DE MILHO NA REGIÃO CENTRO OESTE POR RENDIMENTO FAMILIAR (IBGE, 2004A).....	107
TABELA 22 – INGESTÃO DIÁRIA DE FUMONISINAS E INCIDÊNCIA DE CÂNCER DE ESÔFAGO NO BRASIL.....	108
TABELA 23 - CONTAMINAÇÃO DE FB ₁ E FB ₂ EM CORNFLAKES.....	124
TABELA 24 - CONTAMINAÇÃO DE FB ₁ E FB ₂ EM CREME DE MILHO	125
TABELA 25 - CONTAMINAÇÃO DE FB ₁ E FB ₂ EM FARINHA DE MILHO.....	126

TABELA 26 - CONTAMINAÇÃO DE FB ₁ E FB ₂ EM FLOCOS DE MILHO.....	127
TABELA 27.1 - CONTAMINAÇÃO DE FB ₁ E FB ₂ EM FUBÁ.....	128
TABELA 27.2 - CONTAMINAÇÃO DE FB ₁ E FB ₂ EM FUBÁ (CONTINUAÇÃO).....	129
TABELA 27.3 - CONTAMINAÇÃO DE FB ₁ E FB ₂ EM FUBÁ (CONTINUAÇÃO).....	130
TABELA 28 - CONTAMINAÇÃO DE FB ₁ E FB ₂ EM MILHO PARA PIPOCA.....	131
TABELA 29 - CONTAMINAÇÃO DE FB ₁ E FB ₂ EM MILHO VERDE CONGELADO.....	132
TABELA 30 - CONTAMINAÇÃO DE FB ₁ E FB ₂ EM MILHO VERDE ENLATADO.....	133
TABELA 31 - CONTAMINAÇÃO DE FB ₁ E FB ₂ EM MILHO VERDE IN NATURA.....	134
TABELA 32 - CONTAMINAÇÃO DE FB ₁ E FB ₂ EM SNACKS DE MILHO.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC - Association of Analytical Chemistry

Aw – Atividade de água

CE – Câncer de esôfago

CV – Coeficiente de variação

DIVISA – Departamento de Vigilância Sanitária

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IARC - International Agency for Research on Cancer

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

LACEN-DF – Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal

LEM – Leucoencefalomalácea

NVMAC – Núcleo de Vitaminas, Metais, Aditivos e Contaminantes

OMS (WHO) – Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

pH – potencial hidrogeniônico

PNUMA - Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente

SPE – Extração em fase sólida

ng – nanograma (10^{-9} g)

μ g – micrograma (10^{-6} g)

mg – miligrama (10^{-3} g)

g – grama

kg – quilograma

SUMÁRIO

RESUMO.....	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
SUMÁRIO.....	XII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O FUNGO E O ALIMENTO	3
2.1.1 O milho contaminado	4
2.1.2 Influência do clima no milho contaminado	6
2.1.3 Influência da microflora no milho contaminado	7
2.1.4 Contaminação durante o armazenamento	8
2.1.5 Influência do beneficiamento no milho contaminado.....	9
2.2 FUMONISINAS – AS MICOTOXINAS DO MILHO	14
2.2.1 Variáveis na produção de fumonisinas	19
2.2.2 Toxicidade das fumonisinas em animais.....	21
2.2.3 Mecanismo de toxicidade das fumonisinas.....	22
2.2.4 Incidência em alimentos e efeitos na saúde humana.....	27
2.3 FUMONISINAS EM PRODUTOS A BASE DE MILHO	29
2.4 CONTROLE DA INGESTÃO HUMANA DE FUMONISINAS NA DIETA.....	35
2.5 METODOLOGIA DE ANÁLISE PARA FUMONISINAS EM ALIMENTOS	36
2.5.1 O Processo de Extração e Clean Up	37
2.5.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Resolução.....	39
3 MATERIAIS E METODOS.....	52
3.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAL DE CONSUMO	52
3.2 PRODUTOS ANALISADOS	53
3.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS FB ₁ E FB ₂ EM PRODUTOS DE MILHO	54
3.3.1 Preparo das amostras.....	55
3.3.2 Extração.....	56
3.3.3 Clean up.....	62
3.3.4 Derivação.....	69
3.3.5 Condições de trabalho para HPLC.....	76
3.3.6 Curva Padrão.....	78
3.4 CÁLCULO DA INGESTÃO DE FUMONISINAS	79

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
4.1	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE	80
4.1.1	Extração para diferentes produtos de milho.....	80
4.1.2	Validação da etapa de clean up.....	80
4.1.3	Aplicação de colunas SPE SAX de diferentes marcas.....	81
4.1.4	Estabilidade do derivado NDA-FB.....	82
4.1.5	Curva Padrão	84
4.1.6	Condições de Trabalho do HPLC	84
4.1.7	Validação da Metodologia.....	88
4.2	CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS FB ₁ E FB ₂ EM PRODUTOS DE MILHO.....	91
4.3	INGESTÃO DE FUMONISINAS PELO CONSUMO DE MILHO E OS RISCOS PARA A SAUDE.....	100
5	CONCLUSÕES	109
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
	ANEXO.....	124

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são substâncias produzidas durante o metabolismo secundário de fungos filamentosos, que contaminam alimentos e rações animais, produzindo efeitos agudos, micotoxicoses, ou crônicos, via de regra, carcinogênicos (MIDIO et al., 2000). As fumonisinas são micotoxinas relacionadas estruturalmente produzidas por fungos de uma série de espécies de *Fusarium* morfológicamente afins e pelo gênero *Alternaria* (VINCELLI et al., 2002; LOGRIECO et al., 2002; RHEEDER et al., 2002; JECFA, 2001; FAO / OMS / PNUMA, 1999; MARÍN et al., 1999b; ABBAS et al., 1996). Tem demonstrado atividade carcinogênica, sendo hepatotóxica, nefrotóxica e hepatocarcinogênica para ratos, causando edema pulmonar em suínos e leucoencefalomalácia (LEM) em eqüinos (THIEL et al., 1991b; MALLMANN et al., 1999). Com relação à saúde do homem, tem sido encontrada uma correlação positiva entre maiores concentrações de fumonisina nos alimentos e alta incidência de câncer de esôfago (CE) em regiões da África (SHEPHARD et al., 2000; THIEL et al. (1992) apud BRAGAGNOLO et al., 1994; SYDENHAM et al., 1990b); EUA (SHEPHARD et al., 2000), China (YOSHIZAYA et al., 1994) e Itália (SHEPHARD et al., 2000). Algumas regiões brasileiras apresentaram correlação similar, como os estados de São Paulo (BITTENCOURT et al., 2005) e de Santa Catarina (VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003).

As fumonisinas são encontradas em diversas culturas de plantas no mundo inteiro (DOOHAN et al., 2003; JAY, 1992), mas principalmente no milho (MUNKVOLD, 2003; MALLMANN et al., 1999; RICE et al., 1995; THIEL et al., 1991a). As concentrações encontradas são variáveis devido às condições climáticas, condições de plantio do milho, maturação dos grãos de milho, entre outros (VINCELLI et al., 2002). No Brasil, como as condições climáticas são consideradas favoráveis à produção destas micotoxinas (MIDIO et al., 2000) e é evidenciado um consumo significativo de milho (ABIMILHO, 2003), estudos de risco se fazem necessários no sentido de prevenir problemas de saúde da população.

A metodologia oficial da Association of Analytical Chemistry (AOAC) para quantificação de fumonisinas em milho integral maduro emprega HPLC com detecção por fluorescência (SYDENHAM et al., 1996). Devido à implantação da metodologia e à

variedade de produtos de milho a serem analisados tornam-se necessárias adaptações da metodologia de referência para posterior validação (LEITE, 2002). A metodologia refinada e validada neste trabalho permite a quantificação das contaminações por fumonisinas B₁ e B₂ nas amostras de fubá, creme de milho, farinha de milho, flocos de milho, milho para pipoca, cornflakes e snacks de milho e por fumonisina B₁ nas amostras de milho verde *in natura*, milho congelado e milho enlatado.

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer em Lyon, França, classificou as toxinas produzidas por *F.moniliforme* como possíveis carcinogênicos em humanos (MARASAS, 2001; IARC, 1993) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) fixou em fevereiro de 2001 o limite de 2 µg/Kg de peso corporal ao dia como ingestão diária tolerável máxima temporária (FAO / WHO, 2002). A ingestão diária provável de fumonisinas pode ser calculada a partir do consumo de produtos de milho e das contaminações encontradas na localidade para estes produtos. A ingestão diária provável estimada pode ser então comparada com o limite temporário sugerido pela OMS. A partir desta comparação pode-se estabelecer uma avaliação de risco.

1.1 OBJETIVO GERAL

Validar metodologia de análise permitindo a quantificação da contaminação de fumonisinas B₁ e B₂ em produtos de milho consumidos pela população do Distrito Federal e avaliar o risco à saúde humana advindo do consumo de produtos contaminados.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implantar e validar a metodologia de quantificação de Fumonisinas B₁ e B₂ por HPLC/fluorescência em produtos derivados de milho;
- Analisar as amostras de produtos de milho coletadas no Distrito Federal quanto às concentrações de B₁ e B₂;
- Avaliar a exposição da população do DF à fumonisinas por meio do consumo de produtos de milho e a significância desta exposição para a saúde humana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O FUNGO E O ALIMENTO

Os fungos ou bolores são microrganismos usualmente multicelulares que variam em tamanho e morfologia, desde leveduras de uma única célula até cogumelos pluricelulares gigantescos (PELCZAR, 1980). Os fungos verdadeiros são formados por filamentos denominados hifas, que por sua vez, formam o micélio, que fixa o fungo ao substrato e promove a reprodução pela produção de esporos (SIQUEIRA, 1995; JAY, 1992; PELCZAR et al., 1980). Os esporos podem ser transportados pela água, vento, plantas, produtos e subprodutos, sendo resistentes às oscilações de temperatura e podendo permanecer dormentes no solo por vários anos. Os fungos podem ser encontrados em qualquer ambiente, como solo, água, ar, plantas e matéria orgânica em decomposição, crescendo em quase todos os tipos de substratos (MÁRCIA et al., 1998).

Os fungos afetam a vida do homem de diversas formas, seja no emprego da biotecnologia em nosso favor ou de modo negativo por meio da concorrência pelo nosso alimento. Como os alimentos são constituídos de substâncias orgânicas, na maioria nutrientes, os mesmos tornam-se excelente substrato para crescimento de fungos. Podem ser agentes fundamentais na produção de alimentos fermentados, como em vários tipos de queijos, porém, na maioria das vezes, sua presença torna o alimento impróprio para consumo, seja pelas alterações enzimáticas que levam a formação de odores e sabores desagradáveis ao paladar humano ou também pelo risco da presença de substâncias tóxicas (MAGAN et al., 2003; SILVA, 2000; MIDIO et al., 2000; JAY, 1992).

Os principais fatores que influenciam o crescimento dos fungos nos alimentos são a concentração de íons de hidrogênio (pH e acidez), a atividade de água (a_w)¹, o potencial de oxi-redução, os nutrientes e a presença ou ausência de substâncias inibidoras (SILVA, 2000; SIQUEIRA, 1995; GAVA, 1979). Estes microorganismos

¹ “Atividade de água ou água livre de um alimento é a água que apresenta as mesmas propriedades da água pura, que está disponível pra o crescimento de microrganismos e para reações enzimáticas, mas que não flui livremente do alimento quando o mesmo é cortado” (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004).

podem germinar em baixas atividades de água e têm a capacidade de crescer dentro de uma escala ampla de valores de pH (SILVA, 2000; SIQUEIRA, 1995; JAY, 1992), possuindo um ótimo de crescimento, para a maioria das espécies, em torno de 5,6 (PELCZAR et al., 1980). A maioria é estritamente aeróbia e seu crescimento é estimulado pelo fornecimento abundante de oxigênio, desenvolvendo-se em ampla faixa de temperatura (PELCZAR, 1980).

A flora microbiana dos cereais geralmente é constituída pela flora do solo, do ambiente e dos locais onde são armazenados os grãos, e por contaminações ocorridas no processamento (MAGAN et al., 2003; JAY, 1992). Os fungos desta flora podem ser classificados, de acordo com a etapa na produção de alimentos que invadem os grãos e sementes, em fungos de campo ou de armazenamento. A distinção entre fungos de campo e de armazenamento não é baseada na classificação taxonômica, mas depende das condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento dos mesmos, nos seus hábitos de crescimento e onde os danos ocorrem (MÁRCIA et al., 1998).

Os fungos encontrados com maior frequência nos alimentos pertencem aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Thamnidium*, *Tricothecium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Monilia* e *Mucor* (SILVA, 2000; JAY, 1992).

2.1.1 O milho contaminado

O gênero *Fusarium* compreende uma série de espécies nativas (fungos selvagens) encontradas no mundo inteiro, em diversas condições climáticas, que se desenvolvem em uma grande variedade de plantas (DOOHAN et al., 2003; JAY, 1992), principalmente no milho (MUNKVOLD, 2003; MALLMANN et al., 1999; RICE et al., 1995; THIEL et al., 1991a). Estes fungos produzem no milho uma grande variedade de doenças de campo, ocorrentes em diferentes estágios do desenvolvimento da planta, infectando as raízes, o talo e as sementes (DOOHAN et al., 2003; MUNKVOLD, 2003; VINCELLI et al., 2002; MUNKVOLD et al., 1997).

Dentre as principais espécies de *Fusarium* presentes no milho encontramos o *F. verticilloides*, *F. proliferatum* e *F. graminearum*, fungos produtores de toxinas

denominadas micotoxinas (VINCELLI et al., 2002; LOGRIECO et al., 2002). *F. verticillioides*, conhecido formalmente como *F. moniliforme* é encontrado com muita freqüência em milho (L'VOVA et al., 2003; VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003; ALMEIDA et al., 2002; GONZÁLEZ et al., 2001; ORSI et al., 2000; ONO et al., 1999; MILLER, 1995), podendo estar presente em muitas plantas que não apresentam sintomas da doença. O *F. proliferatum* é quase tão comum no milho quanto o *F. moniliforme* nas regiões de clima tropical, e pode ser isolado dos tecidos que apresentam sintomas aparentes ou não, incluindo a semente (MUNKVOLD et al., 1997).

Os grãos de milho podem ser contaminados pelo *F. moniliforme* de diversas formas. A mais comum é provavelmente pela própria planta como mostra a FIGURA 1. Na cobertura do solo, na qual se encontram resíduos dos pés de milho, são produzidos esporos pelo fungo. Os esporos podem se instalar na planta tendo como veículo e vetor o ar e insetos. Uma vez fixados, germinam infectando a planta, principalmente as que estão em processo de maturação fisiológica do grão. O fungo pode contaminar os grãos pelas escoriações da planta ou pelas fendas ou falhas da cobertura das espigas. Quando os insetos são os vetores, pode ocorrer a contaminação do pé de milho ou contaminação direta das espigas. Os grãos podem ser ainda infectados via interna, quando a planta apresenta infecção sistêmica, neste caso as plantas são provenientes de sementes contaminadas (VINCELLI et al., 2002; MUNKVOLD et al., 1997).

São medidas de controle da contaminação do milho por *Fusarium* no campo (VINCELLI et al., 2002): a redução do stress da planta, com a seleção de variedades da planta de acordo com o tipo de solo e clima, baixa densidade de plantas por área de plantio, adubação adequada, e, no caso de monoculturas, técnicas de rotação para reduzir o inoculo de fungos contaminantes; o controle de insetos que podem danificar a planta e/ou servirem de vetores da contaminação; e o emprego de fungicidas, apesar de que alguns autores questionarem a eficácia deste último (D'MELLO et al., 1998; MAGAN et al., 2003; HASAN, 1999), pois as espécies de *Fusarium* ocorrem comumente no campo mesmo na ausência de sintomas das doenças relacionadas (D'MELLO et al., 1998).

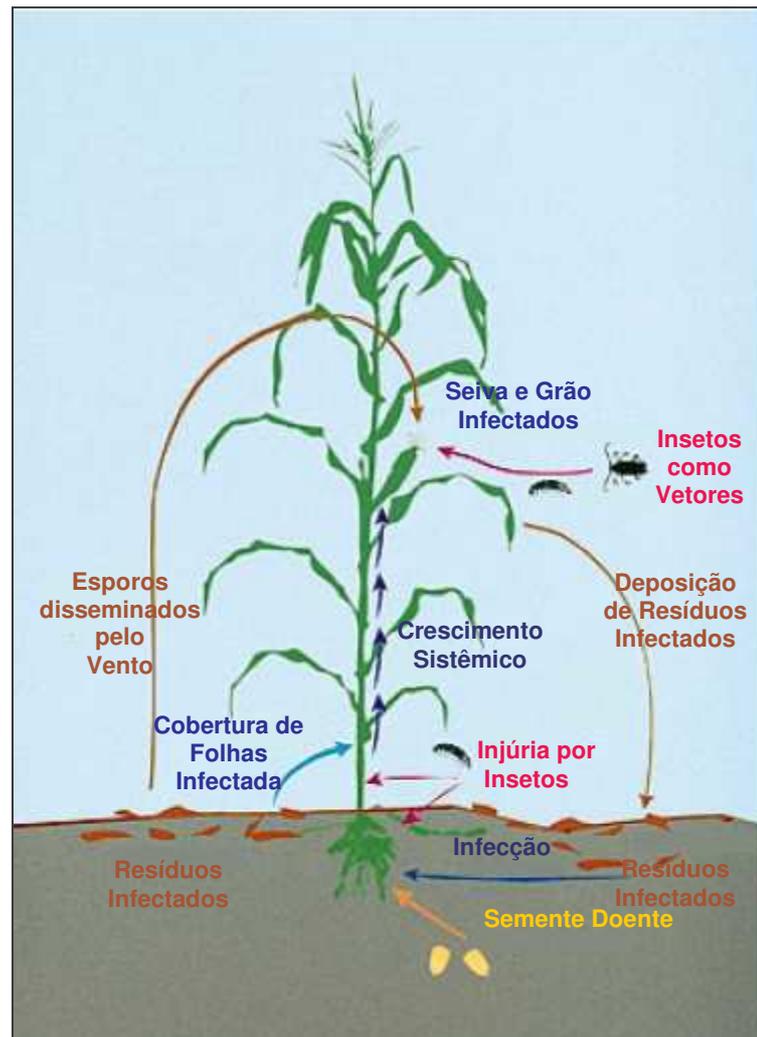


FIGURA 1 – POSSÍVEIS VIAS DE CONTAMINAÇÃO NO CICLO DA DOENÇA DO FUSARIUM NO MILHO (MUNKVOLD et al., 1997).

2.1.2 Influência do clima no milho contaminado

As condições climáticas dos países tropicais (temperatura e umidade elevadas) favorecem a proliferação de fungos nos produtos agrícolas, principalmente grãos, determinando altos teores de seus metabólitos, incluindo as micotoxinas, nos alimentos provenientes dessas regiões (MIDIO et al., 2000). Em estudo realizado em Zimbábue (GAMANYA & SIBANDA, 2001) demonstrou-se que a incidência de *F. moliniforme* e de outras espécies *Fusarium* geralmente decrescem de regiões de alto índice pluviométrico e temperatura anual moderada para regiões de baixo índice pluviométrico. As doenças de maior importância causadas na espiga de milho relacionadas ao *Fusarium* ocorrem nas regiões produtoras mais quentes,

especificamente de clima tropical e subtropical (DILKIN et al., 2002; THIEL et al., 1991a) e estão associadas a anos quentes e a danos por insetos (FAO/OMS/PNUMA, 1999).

Em um estudo realizado no Estado do Paraná, região de clima subtropical, foi possível observar uma alta frequência de *F. moliniforme* dentre as espécies de fungo encontradas em amostras de milho (ONO et al., 1999). Foi proposta associação das diferenças de contaminação encontradas entre as diversas regiões do Estado com relação as variáveis temperatura máxima média, umidade relativa e índice pluviométrico. Mostrou-se que não havia diferença significativa nas contaminações considerando-se as variações de temperatura e de umidade relativa observadas, podendo as maiores contaminações encontradas serem resultados de um maior índice pluviométrico no período que procederam ao estudo. Num estudo realizado no Estado de São Paulo (ALMEIDA et al., 2002), *F. moliniforme* se apresentou em maior frequência em grãos com atividade de água entre 0,71 e 0,81 em Capão Bonito e entre 0,81 e 0,84 em Ribeirão Preto. As maiores contaminações foram registradas em períodos de menor índice pluviométrico. Em Minas Gerais e São Paulo, ORSI et al (2000) encontram uma correlação negativa entre a contaminação por *Fusarium* e temperatura média e umidade relativa e correlação positiva com a umidade do grão estocado.

2.1.3 Influência da microflora no milho contaminado

Os fungos esporulados colonizam o grão por meio de recursos próprios para ocupação e manutenção de uma condição favorável. A conquista de um nicho pelo fungo depende de suas taxa de germinação, taxa de crescimento, produção enzimática e capacidade de esporulação. A sua manutenção no substrato dependerá das relações de antagonismo entre outras espécies e gêneros de microrganismos presentes (MAGAN et al., 2003). Velluti et al. (2000) mostraram a influência da composição da microbiota do milho no desenvolvimento de espécies de *Fusarium* pela competição entre *F. moliniforme*, *F. proliferatum* e *F. graminearum* em milho inoculado em laboratório em diferentes condições de temperatura (15°C e 25°C) e atividade de água (0.93, 0.95 e 0.98). Observou-se que o crescimento das espécies era

diferenciado quando isoladas ou em conjunto com outras. Na presença de *F. graminearum* houve diminuição no crescimento de *F. moliniforme* e *F. proliferatum*. Esta concorrência foi afetada por fatores abióticos, como aw e temperatura.

2.1.4 Contaminação durante o armazenamento

Durante o armazenamento, os fatores que afetam o crescimento de fungos nos grãos de milho incluem teor de umidade dos grãos, temperatura, tempo, condição física e sanitária do grão, intensidade de inoculação do fungo, conteúdo de oxigênio, armazenamento anterior, e a presença de insetos e de ácaros (MÁRCIA et al., 1998; MAGAN et al., 1988).

O crescimento de fungos além de causar mudanças organolépticas indesejáveis pode contribuir com o aquecimento dos grãos e perda nutricional (MAGAN et al., 2003). Marín et al. (1999a) demonstram que a colonização do milho por fungos como *Fusarium spp.* pode resultar em significantes perdas calóricas do grão em atividades de água superiores a 0,95 associadas a uma maior produção de micotoxinas.

Danos físicos dão ingresso à germinação de esporos em grãos que não receberam o devido tratamento de secagem (MAGAN et al., 2003). A invasão de um lote de grãos por insetos pode iniciar ou agravar o desenvolvimento de fungos, pois em decorrência de sua atividade metabólica há um aumento de temperatura da massa dos grãos e do teor de umidade via condensação (MAGAN et al., 2003; MÁRCIA et al., 1998).

O *Fusarium ssp* invade grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita. Estes fungos não se desenvolvem normalmente durante o armazenamento, exceto em milho armazenado com alto teor de umidade (MÁRCIA et al., 1998, MAGAN et al., 1988). Tal fato pode ser enfatizado pelo estudo de ONO et al (1999) no qual verificou-se que os resultados das maiores contaminações por *Fusarium* encontradas em algumas regiões do Estado do Paraná em amostras de milho recém colhido eram similares aos encontrados no milho armazenado. Outra evidência seria a observação do decréscimo na ocorrência de *Fusarium* de 18%, 43% e 24% em milho estocado após seis meses de armazenamento das safras de 1999, 2000 e 2001, em Benin África (FANDOHAN et al., 2004).

Geralmente, o teor de umidade de grãos estocados é equivalente a uma atividade de água menor ou igual a 0,70 (MAGAN et al., 2003) o que corresponderia a uma umidade inferior a 14% (VINCELLI et al., 2002). Marin et al. (1996) verificaram a germinação de esporos de *F. moliniforme* e *F. proliferatum* em *aw* mínima de 0,88 em estudo realizado com culturas espanholas isoladas de extrato de farinhas de granulometria média de milho. As condições ótimas de germinação de esporos verificadas para *F. moliniforme* foram de *aw* entre 0,96 e 0,98 e temperaturas entre 25 e 37°C e para *F. proliferatum* de 30°C independente da *aw* (DOOHAN et al., 2003). *Fusarium ssp* são capazes de germinar e crescer em atividades de água entre 0,90 e 0,995 (MARÍN et al., 1998).

De acordo com Etcheverry et al. (2002) a utilização de antioxidantes alimentares pode ser um meio de controle da produção de fumonisinas ao demonstrar influência de butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), tri-hidroxi-butilfenona (THBP) e propil-paraben (PP) no crescimento de espécies de *Fusarium Liseola* diminuindo a produção de fumonisinas mesmo em atividades de água de 0,95 e 0,995.

2.1.5 Influência do beneficiamento no milho contaminado

Cerca de 82% de todo o milho produzido internamente no Brasil é consumido sob a forma de ração, enquanto seu processamento em alimentos voltados ao consumo humano está estável desde o início da década de 80, em 13% da produção total (ABIMILHO, 2003). A maior parte do milho destinado ao aproveitamento animal vai para a criação de suínos, aves de corte, que representam 30% da disponibilidade total de carne no país (incluindo bovina e pescado) (ABIMILHO, 2003).

Na alimentação humana estão presentes os produtos vendidos diretamente ao consumidor por meio da rede de varejistas, como o creme de milho, farinha de milho, farinha pré-cozida flocada, farinha pré-cozida, flocos de milho, fubá mimoso (fino e médio), canjiquinha (fina e média), canjica (branca e amarela), polenta, polenta pré-cozida, pipoca de milho, salgadinhos, cuscuz e angu. O milho entra na composição de diversos alimentos infantis, doces, balas, sucos, molhos, sopas, vegetais enlatados, bebidas achocolatadas e produtos de panificação na forma de amido (extraído do

endosperma do milho) ou na forma de maltose e glicose (obtidos da hidrólise do amido de milho). Na forma de xarope de glicose, o milho transforma-se em matéria-prima para sorvetes, geléias, gomas de mascar, licores e sobremesas diversas, entre outros (ABIMILHO, 2003).

Em trabalho realizado no Brasil por MARCIA et al. (1998) a intensidade de contaminação das amostras de milho em grão, canjica e fubá, por fungos de campo e de armazenamento coletadas antes e após o processamento foi analisado. No período de agosto a dezembro de 1994, 97,5% das 79 amostras de milho em grão, 13,6% das 11 mostras de canjiquinha e 79% das 64 amostras de fubá estavam contaminadas com *Fusarium*.

A menor contaminação por fungos encontrada em alguns produtos de milho (MÁRCIA, et al., 1998) ocorre, normalmente, em função dos processos pelos quais estes produtos são obtidos. O grão de milho possui como principais constituintes o amido, o gérmen, o glúten e o pericarpo (FIGURA 2). O amido é o maior constituinte do grão; do gérmen localizado na parte inferior central do grão é extraído o óleo; o glúten extraído da parte central do grão possui a maior concentração de proteínas do mesmo; e o pericarpo é a cobertura do grão formada principalmente por fibras (FDA, 2001_b).

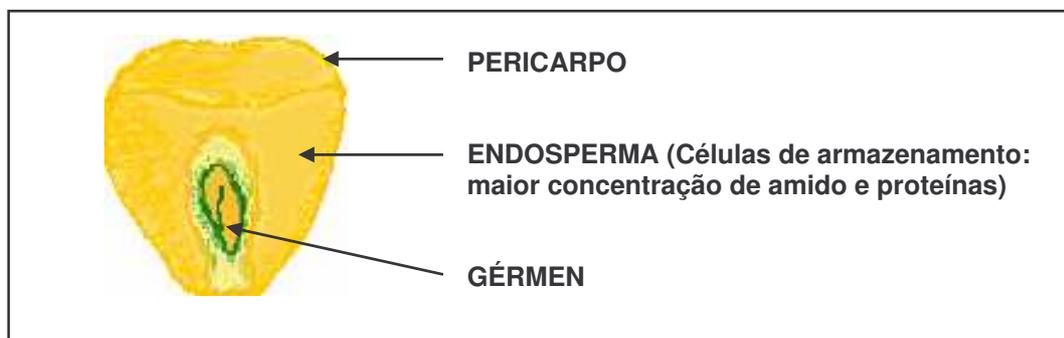


FIGURA 2 – MORFOLOGIA DO GRÃO DE MILHO.

Durante o processo de beneficiamento e moagem (FIGURA 3) ocorre a separação parcial ou total destes constituintes de acordo com o produto a obter: amido, gérmen, glúten, farelo ou combinações como fubá, canjica, creme de milho e outros (FIGURA 3).

No estudo de MARCIA et al. (1998) as amostras de canjiquinha, produto de milho constituído de partículas de 2,5-3,0 mm de diâmetro removidas da porção interna superior do grão de milho (constituídas do endosperma vítreo), apresentaram níveis de infecção baixos por *Fusarium* quando comparados ao fubá e ao grão de milho avaliados. A diferença básica entre o grão de milho, fubá e canjica está na retirada do gérmen e pericarpo e classificação por granulometria em etapas da moagem. O gérmen é extraído no início do processo de beneficiamento e o pericarpo separado após a moagem (FIGURA 3). O fubá, de menor granulometria mistura-se em maior proporção com o pericarpo do que a canjica, que pode ser facilmente separada do pericarpo (FIGURA 3). Fumonisinias, micotoxinas do *Fusarium*, são encontradas concentradas no gérmen e no pericarpo (fibras) do grão de milho (FDA, 2001_b). Sydenham et al. (1994) observaram uma redução na contaminação de 26,2 a 69,4% por fumonisinias em um carregamento de milho a granel importado da África do Sul apenas pela separação física das partículas finas (< 3 mm) do restante (80 a 95% do carregamento). Murphy et al. (1993) encontraram concentrações de fumonisinias aproximadamente dez vezes maiores em amostras de farelo de milho do que em amostras de grão de milho integral. Logo, cada fração de moagem apresentaria diferentes concentrações de metabólitos do fungo, o que pode sugerir o crescimento concentrado do fungo no gérmen e pericarpo do grão.

A redução da contaminação de fumonisinias no milho pode ser efetuada então pela retirada do farelo e gérmen do grão. Outra hipótese seria a separação dos grãos contaminados dos grãos sadios, já que os primeiros costumam apresentar maiores contaminações (FDA, 2001_b). Antes do beneficiamento, o grão contaminado por fumonisinias, devido a sua menor densidade pode ser separado dos demais pela imersão em solução saturada de cloreto de sódio diminuindo em até 86% da contaminação do material original (SHETTY & BHAT, 1999).

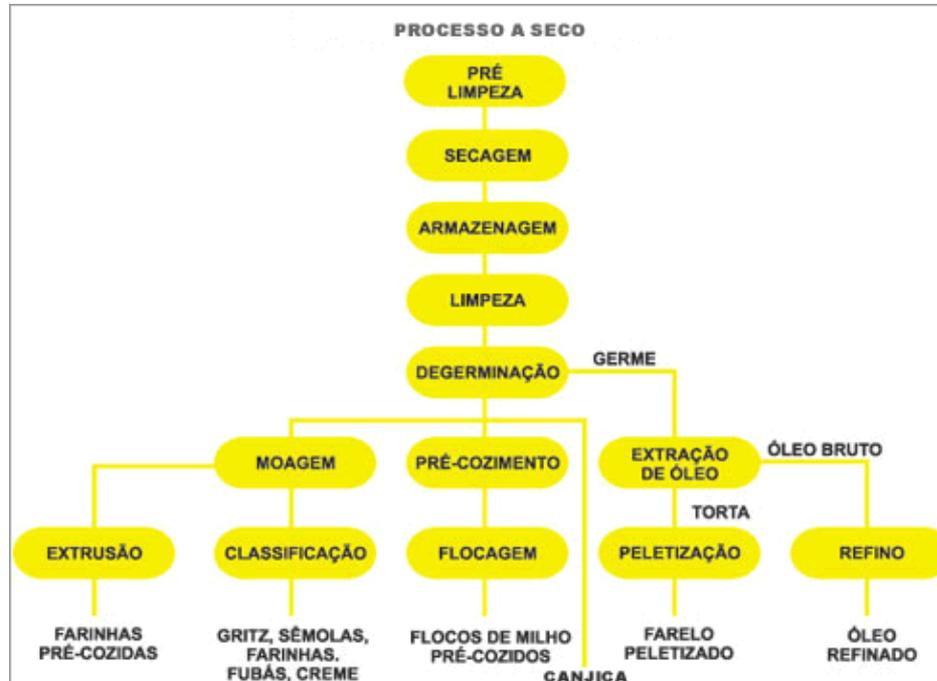
O milho, matéria-prima em diversos produtos alimentícios, além de ser adicionado ou não de uma série de ingredientes, pode sofrer uma grande diversidade de processos de conservação como esterilização, secagem, adição de solutos e outros no intuito de prolongar a vida-de-prateleira do mesmo atribuindo características organolépticas específicas ao produto final (SILVA, 2000; GAVA, 1979). Estes

procedimentos podem levar ou não à redução de micotoxinas no produto final (JECFA, 2001). Na FIGURA 4 são apresentados fluxogramas de produção de snacks e cornflakes que ilustram alguns dos procedimentos adotados na transformação do milho no produto final em questão.

Testes realizados com fumonisinas em solução aquosa a diferentes pHs e temperaturas de aquecimento (JACKSON ET AL., 1996_a; JACKSON ET AL., 1996_b) demonstraram que as fumonisinas FB₁ e FB₂ em temperaturas inferiores a 200°C são mais sensíveis à decomposição em pH 4 e em pH 10 do que em pH 7,0. A decomposição aumenta com o aumento de temperatura e de tempo de tratamento, não ocorrendo de maneira significativa a temperaturas entre 100 e 125°C.

Em alimentos (VOSS et al., 2003; JACKSON et al., 1997), operações como assar, fritar e refogar exercem nenhuma ou muito pequena influência na concentração de fumonisinas dos alimentos. Park et al. (2004) identificam e quantificam a presença de fumonisinas ligadas a proteínas que não são detectadas pelos métodos convencionais de análise. A interação de fumonisinas com proteínas parece ocorrer em produtos tratados termicamente como produtos cozidos, extrusados e torrefados.

A industrialização de milho pode ser realizada por dois processos: a seco e a úmido. No processo a seco, o milho, após limpeza e secagem, é degerminado e separado em endosperma e germe. O fluxo do endosperma é moído e classificado para a obtenção de produtos finais, e o germe passa por processo de extração para produção de óleo e farelo.



No processo a úmido, o milho após limpeza e secagem, é macerado, separado em germe, fibras e endosperma, que é separado em amido e glúten. O amido ainda é convertido em xaropes e modificado em dextrinas e amidos especiais. O glúten é seco e recebe a incorporação das fibras e do farelo após extração do óleo para composição de produtos de rações animais.

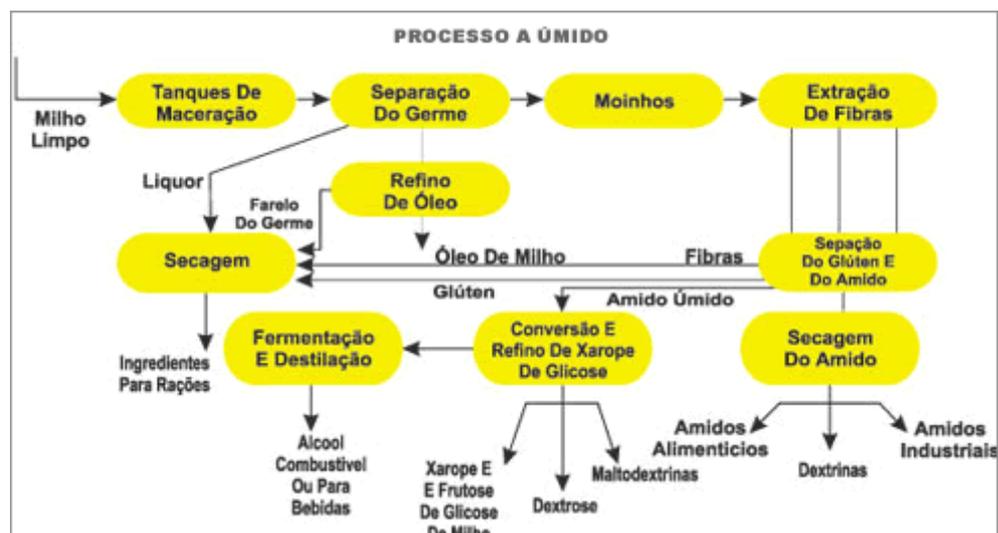


FIGURA 3 – PROCESSO DE INDUSTRIALIZAÇÃO DO MILHO (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS MOAGEIRAS DE MILHO, 2003).

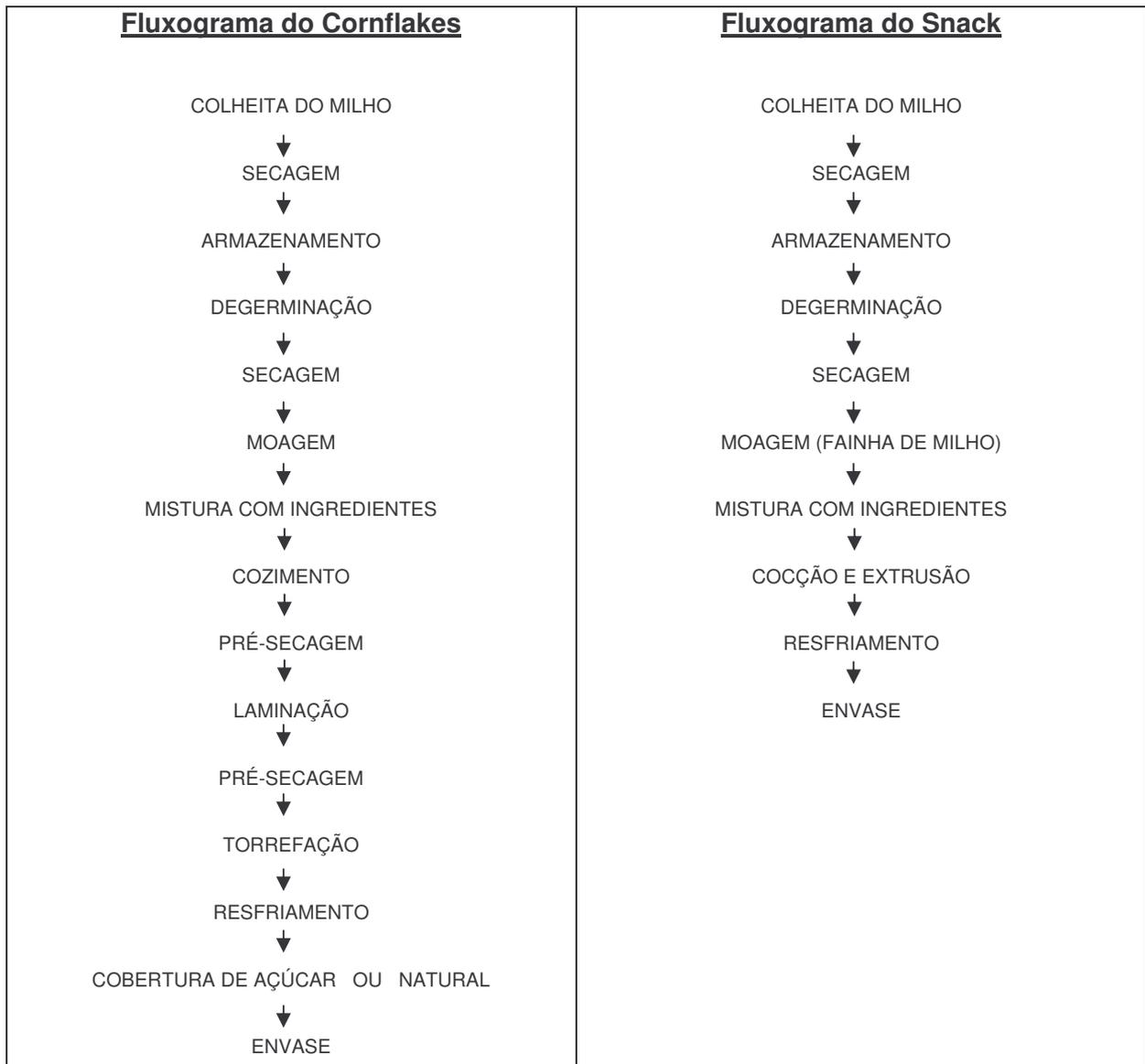


FIGURA 4 – FLUXOGRAMAS DE PRODUÇÃO DE CORNFLAKES E SNACKS.

2.2 FUMONISINAS – AS MICOTOXINAS DO MILHO

Micotoxinas são substâncias produzidas durante o metabolismo secundário de fungos filamentosos, que contaminam alimentos e rações animais (FIGURA 5), produzindo efeitos agudos, micotóxicos, ou crônicos, via de regra, carcinogênicos (MIDIO et al., 2000).

Micotoxina	Fungo Produtor (gênero)	Alimentos (alguns dos)
Aflatoxina	<i>Aspergillus</i>	Amendoim, cereais, castanhas amêndoas
Fumonisinias	<i>Fusarium</i>	Milho, arroz
Ocratoxina A	<i>Aspergillus, Penicillium</i>	Cereais
Tricotecenos	<i>Fusarium, Tricothierium, Myrotherium, Thichoderma, Cephasporium, Verticimonosporium, Stactrybotrys</i>	
Zearalenona	<i>Fusarium</i>	Milho

FIGURA 5 - ALGUMAS MICOTOXINAS, RESPECTIVOS FUNGOS PRODUTORES E ALIMENTOS NOS QUAIS SÃO ENCONTRADAS (CONCON (1988) apud MIDIO et al., 2000; PITTET (1998) apud MIDIO et al., 2000).

As fumonisinas são micotoxinas relacionadas estruturalmente produzidas por fungos de uma série de espécies de *Fusarium* morfologicamente afins (*Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. napiforme*, *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. nygamai*, *F. thapsinum* y *F. globosum*), principalmente pelo *F. Moniliforme* e pelo *F. Proliferatum*, e pelo gênero *Alternaria* (VINCELLI et al., 2002; LOGRIECO et al., 2002; RHEEDER et al., 2002; JECFA, 2001; FAO / OMS / PNUMA, 1999; MARÍN et al., 1999b; ABBAS et al; 1996).

As fumonisinas B₁ e B₂ foram isoladas por Gelderblom et al. (1988) após vários estudos que associavam uma substância tóxica produzida por *Fusarium moniliforme* a doenças em animais e seres humanos (JECFA, 2001; MARASAS, 2001; CAWOOD et al., 1991; SYDENHAM et al., 1991; SYDENHAM et al., 1990). O material de estudo foi isolado de cultura de *F. moliniforme* extraído de milho destinado à alimentação humana em Transkei, África do Sul (Gelderblom et al., 1988).

As fumonisinas foram quimicamente caracterizadas por Bezuidenhout et al. (1988) como poliálcoois que apresentam uma estrutura química básica correspondente ao 2-amino-12,16, dimetilpoliidroxieicosano, esterificado com ácido tricarbóxico-1,2,3 propano, nos carbonos 14 e 15 (FIGURA 6). As fumonisinas FB₃ e FB₄ foram isoladas e caracterizadas por Cawood et al (1991) (FIGURAS 6 e 7).

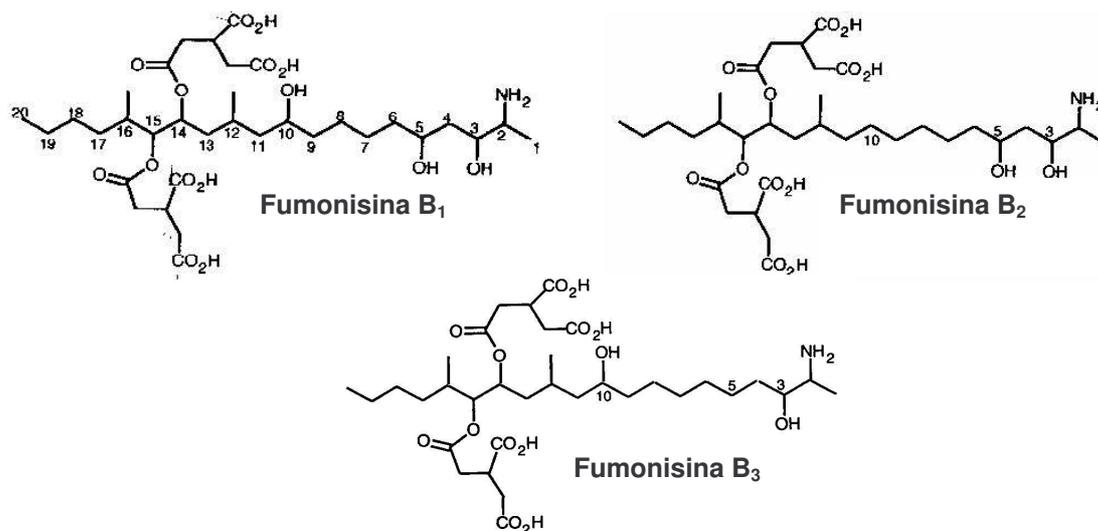
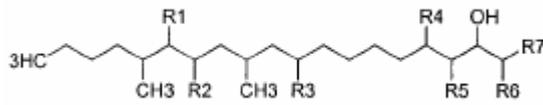


FIGURA 6 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS FUMONISINAS FB₁, FB₂ e FB₃.

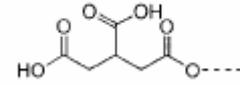
As fumonisinas são moléculas de característica polar sendo solúveis em água e em solventes polares (SHEPHARD, 1998). A fumonisina FB₁, quando pura, é encontrada como pó branco higroscópico, solúvel em água, acetonitrila-água ou metanol. É estável em acetonitrila-água (1:1) e instável em metanol. Nos alimentos é estável a temperaturas de processamento e à luz (WHO, 2000). As fumonisinas FB₁, FB₂, FB₃ e FB₄ possuem respectivamente 721.83, 705,83, 705,83 e 689.84 de massa molecular (JECFA, 2001).

Pelo menos 15 diferentes fumonisinas foram relatadas, e poucas foram identificadas (WHO, 2000). As fumonisinas análogas foram separadas em quatro principais grupos e identificadas como fumonisinas A, B, C e P (RHEEDER et al., 2002; POZZI et al., 2002; SEO & LEE, 1999). A FIGURA 7 (RHEEDER et al., 2002) apresenta as estruturas básicas das fumonisinas e um quadro com as diferenças entre as estruturas químicas das fumonisinas nas posições R_x.

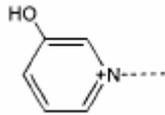
Das fumonisinas identificadas até 2002 as FB₁, FB₂ e FB₃ são as mais isoladas em alimentos naturalmente contaminados (POZZI et al., 2002; FAO / OMS / PNUMA, 1999) sendo encontradas em alimentos e rações a base de milho em todo o mundo.



Esqueleto da Fumonisina



Ácido Tricarboxílico (TCA)



3- Hidroxipiridinium (3HP)

Análogo	Mudanças na estrutura da fumonisina						
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
FA ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃
FA ₂	TCA	TCA	H	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃
FA ₃	TCA	TCA	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃
PHFA _{3A}	TCA	OH	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃
PHFA _{3B}	OH	TCA	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃
HFA ₃	OH	OH	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃
FAK ₁	=O	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃
FBK ₁	=O	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
FB ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
Iso-FB ₁	TCA	TCA	OH	H	OH	NH ₂	CH ₃
PHFB _{1a}	TCA	OH	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
PHFB _{1b}	OH	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
HFB ₁	OH	OH	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
FB ₂	TCA	TCA	H	OH	H	NH ₂	CH ₃
FB ₃	TCA	TCA	OH	H	H	NH ₂	CH ₃
FB ₄	TCA	TCA	H	H	H	NH ₂	CH ₃
FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NH ₂	H
N-acetil-FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	H
Iso-FC ₁	TCA	TCA	OH	H	OH	NH ₂	H
N-acetil-iso-FC ₁	TCA	TCA	OH	H	OH	NHCOCH ₃	H
OH-FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	OH	NH ₂	H
N-acetil-OH-FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	OH	NHCOCH ₃	H
FC ₃	TCA	TCA	OH	H	H	NH ₂	H
FC ₄	TCA	TCA	H	H	H	NH ₂	H
FP ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	3HP	CH ₃
FP ₂	TCA	TCA	H	OH	H	3HP	CH ₃
FP ₃	TCA	TCA	OH	H	H	3HP	CH ₃

FIGURA 7 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS FUMONISINAS ANÁLOGAS

As fumonisinas FB_4 , FA_1 , FA_2 e FC_1 pareciam ocorrer somente em condições de cultura em laboratório (SYDENHAM et al., 1996_b), até que Seo & Lee (1999) reportaram a primeira ocorrência natural de fumonisinas do grupo C e B_4 (FIGURA 8) em milho mofado na Coréia. As fumonisinas C são quimicamente similares às do grupo B (FIGURA 7), sendo as fumonisinas C_1 , C_3 e C_4 idênticas as fumonisinas B_1 , B_3 e B_4 com exceção do grupo metil terminal que não ocorre no primeiro carbono (SEO et al., 1996; BRANHAM et al., 1993). Das 44 amostras avaliadas por Seo & Lee (1999) 32 estavam contaminadas com fumonisinas dos grupos B e C, e seis com somente fumonisinas B.

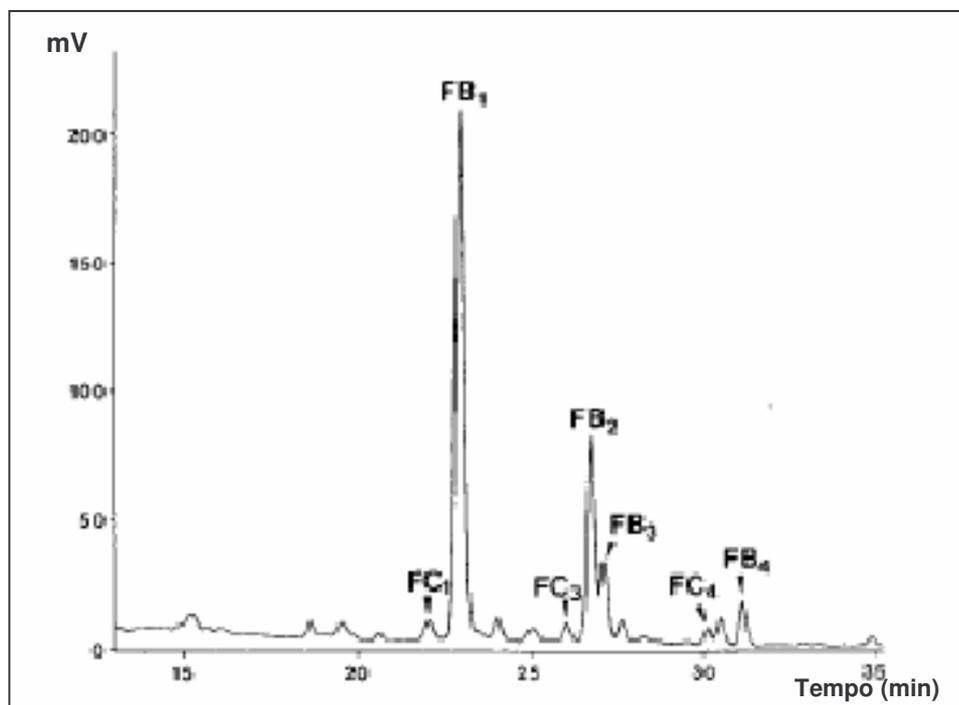


FIGURA 8 – CROMATOGRAMA EM HPLC DE AMOSTRA DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADA COM FUMONISINAS DOS GRUPOS B E C.

As fumonisinas hidrolisadas ($HFB_{1,2,3 \text{ e } 4}$) são resultado de hidrólise alcalina que libera os ácidos tricarbóxicos dos carbonos C_{14} e C_{15} restando a estrutura de um aminopentol (FIGURA 7). Podem ser parcialmente hidrolisadas ($PHFB_{1, 2,3 \text{ e } 4}$) quando apenas um grupo de ácido tricarbóxico é removido (DOMBRINK-KURTZMAN & DVORACK, 1999; POLING & PLATTNER, 1999). As fumonisinas hidrolisadas ou parcialmente hidrolisadas podem ser ainda resultado do metabolismo de fumonisinas ingeridas (POLING & PLATTNER, 1999). A hidrólise de fumonisinas no

processamento de alimentos geralmente ocorre em produtos de milho preparados por cocção em meio alcalino² (DOMBRINK-KURTZMAN & DVORACK, 1999), sendo favorecida sob influência do pH em processos de secagem, mas não em maiores temperaturas de ebulição durante processos de cocção (DE LA CAMPA et al., 2004). A hidrólise completa das fumonisinas sob o tratamento térmico em meio alcalino foi observada em culturas de *Fusarium*, enquanto que em alimentos as conversões observadas limitaram-se a valores menores ou iguais a 5% (VOSS et al, 2001). As fumonisinas hidrolisadas foram encontradas em tortilhas, massa ou preparado para tortilhas e em milho amarelo enlatado (DOMBRINK-KURTZMAN & DVORACK, 1999; POLING & PLATTNER, 1999; STACK, 1998; HOPMANS & MURPHY, 1993).

2.2.1 Variáveis na produção de fumonisinas

As micotoxinas são produzidas por cada unidade filamentosa que constitui o fungo. Logo, o acúmulo de fumonisinas é consequência da presença de milhões de células resultantes do total de biomassa do fungo. A produção ocorre em tensões de oxigênio relativamente altas e aparentemente requer um baixo pH como condição ótima. O pH do milho contaminado em processo de alteração é baixo devido à produção de ácidos orgânicos originados do metabolismo do amido (MILLER, 2001).

Das fumonisinas mais isoladas nos alimentos, a fumonisina B₁, é a predominante (quase sempre 70% da concentração de todas as fumonisinas), e as fumonisinas B₂ e B₃ são encontradas em menores concentrações, além das formas amino acetiladas (FIGURA 7) destas (DILKIN et al., 2002; FAO / OMS / PNUMA, 1999; SYDENHAM et al., 1990; THIEL et al., 1991a) podendo-se algumas vezes observar maiores concentrações de FB₂ e FB₃ (FAO / OMS / PNUMA, 1999).

Segundo Nelson et al. (1991), as subespécies de *Fusarium moliniforme* podem ser classificadas de acordo com as concentrações de fumonisinas produzidas: produtoras fracas (em até 50 mg.kg⁻¹), moderadas (de 50 - 500 mg.kg⁻¹) e fortes (ou

²As tortilhas são exemplos de produto de milho que passam por este tipo de processamento no qual ocorre cozimento do grão de milho em água com 1% de Ca(OH)₂ por aproximadamente 1 hora e posterior eliminação da água de cozimento e pericarpo (DOMBRINK-KURTZMAN & DVORACK, 1999).

ativas) produtoras (acima de 500 mg.kg^{-1}). Em estudo realizado na Rússia, das 86 subespécies de *F. moliniforme* avaliadas, 38,4% foram consideradas fracas, 30,2% moderadas e 31,4% fortes produtoras (L'VOVA et al., 2003). Já em Ghana, País do oeste da África, 91% das subespécies de *F. moliniforme* isoladas das amostras de milho avaliadas foram classificadas como fortes produtoras, assim como a maioria das subespécies isoladas em Benin, África (FANDOHAN et al., 2004). Em Ghana, as quatorze amostras de milho destinadas ao consumo humano apresentaram concentrações de fumonisinas ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2 + \text{FB}_3$) de 0,07 a $4,22 \text{ mg.kg}^{-1}$ com média de $0,84 \text{ mg.kg}^{-1}$ (KPODO et al., 2000).

Marín et al. (1999b) mostraram que, isoladamente, *F. proliferatum* tem um ótimo de produção de fumonisina B_1 a 15°C e atividade de água (a_w) de 0,97 enquanto *F. moliniforme* o faz a 30°C e a_w de 0,97 em maior concentração. A produção de FB_1 por *F. moliniforme* cultivado isoladamente apresenta variações na concentração de acordo com a temperatura, enquanto a concentração produzida por *F. proliferatum* é quase constante. Os grãos mantidos em temperaturas menores que 10°C não apresentaram contaminação por FB_1 mesmo em a_w maior ou igual a 0,93 (MARÍN et al., 1999b).

Em experimentos realizados com *F. moliniforme* e *F. proliferatum* variando-se a_w , temperatura e período de incubação, uma maior concentração de fumonisinas foi produzida a temperatura de 30°C e a_w de 0,98. A produção de fumonisinas se mostrou dependente da temperatura e da a_w com produção em concentrações significativas para a saúde de animais e seres humanos em a_w maior que 0,95 (MARÍN et al., 1999a).

A produção de FB_1 pode diminuir quando oriunda de *F. proliferatum* na presença de *F. graminearum*, enquanto pode aumentar em condições específicas de a_w e temperatura quando oriundas de *F. moliniforme* na presença de *F. graminearum*, não havendo indícios de que a produção de FB_1 seja influenciada pela presença de zearalenona, micotoxina produzida por *F. graminearum* (VELLUTI et al., 2000).

Fusarium ssp não contamina o milho de forma isolada, sendo a composição da microflora presente importante para determinação de seu desenvolvimento e produção de fumonisinas (MARÍN, 1999b). Marin et al (1988) estudaram interações entre espécies de *Fusarium* e *Aspergillus niger* que resultaram num aumento de dez vezes

na concentração de fumonisinas, especialmente em atividade de água de 0.98. Não foi observado qualquer aumento de concentração de fumonisinas em milho devidamente desidratado (MAGAN et al., 2003).

O milho colhido na forma de grão passa por quatro principais estágios diferenciados de desenvolvimento. Primeiro o estágio de florescimento quando são formados os grãos; segundo o estado de grão leitoso quando começa a ocorrer o acúmulo de amido e os grãos começam a encher; terceiro o estado de grão pastoso no qual há acúmulo rápido de matéria seca e o grão possui cerca de 80% de umidade e por último de grão farináceo quando se dá o início da maturação do grão. Nesta última fase, os grãos começam a dentar e a endurecer devido à perda de umidade que vai de 70% a aproximadamente 30 a 35% no final da maturação (RICHIE et al., 2003). Warfield & Gilchrist (1999) realizaram estudo com objetivo de verificar a relação entre a produção de fumonisina B₁ por *F. moliniforme* e os estágios de desenvolvimento do grão (florescimento, leitoso, pastoso e dentado). Foi observado que quanto mais avançado o estágio de desenvolvimento do grão maior a produção de fumonisina, mas FB₁ foi encontrada em todos os estágios de desenvolvimento do grão.

2.2.2 Toxicidade das fumonisinas em animais

Estudos têm demonstrado que a fumonisina B₁ apresenta atividade carcinogênica, sendo hepatotóxica, nefrotóxica e hepatocarcinogênica para ratos, causa edema pulmonar em suínos e leucoencefalomalácia (LEM) em eqüinos (THIEL et al., 1991b; MALLMANN et al. 1999). Posteriormente outros estudos mostraram que a FB₂ e FB₃ também apresentam atividade semelhante (GELDERBLOM et al., 1992; MIDIO & MARTINS, 2000).

A LEM foi caracterizada por Kellerman et al (1988) como uma doença neurotóxica de cavalos e de outros eqüídeos pela necrose liqüefativa da massa branca dos hemisférios cerebrais levando a morte do animal (THIEL et al., 1991b). Os sintomas se manifestam por sinais clínicos que incluem apatia, desordem nervosa, paralisia do lábio inferior e problemas de mobilidade (MARASAS et al. (1984) e KELLERMAN et al (1988) apud SYDENHAM et al., 1992b). A identificação das fumonisinas como causadoras de LEM foi possível após a evidência de que amostras

de milho e ração a base de milho com altas concentrações destas micotoxinas estavam associadas a casos confirmados da doença (MURPHY et al., 1993; SYDENHAM et al., 1992b; THIEL et al., 1991b). Adicionalmente, vários estudos demonstraram a indução da LEM após a administração intravenosa repetitiva de FB₁ pura em cavalos (THIEL et al., 1991b). Nos EUA, as concentrações de fumonisinas encontradas (FB₁ + FB₂) nas rações associadas a casos de LEM em 1990 variaram de 1,4 mg.kg⁻¹ a 39,6 mg.kg⁻¹ (THIEL et al., 1991b).

2.2.3 Mecanismo de toxicidade das fumonisinas

A teoria de WANG et al. (1991) sobre a toxicidade das fumonisinas é baseada na similaridade estrutural das fumonisinas com os esfingolípídeos (FIGURA 9). Os esfingolípídeos são classificados em esfingomielina, cerebrosídeos e gangliosídeos dependendo da substância ligada à estrutura básica, o aminoálcool esfingosina (ROSKOSKI JR., 1997). A ceramida (N-acetilesfingosina) é um intermediário da biossíntese destas três principais classes (MURRAY et al., 2002; MERRILL JR. et al., 1997; ROSKOSKI JR., 1997) e é sintetizada em quatro reações a partir dos precursores palmitoil-CoA e serina (MERRILL JR. et al.(1996) apud MERRILL JR. et al., 1997). A similaridade entre as fumonisinas e a esfingosina levaria à inibição do metabolismo de esfingolípídeos devido à inibição da ceramida sintetase (esfingosina N-acetil transferase) (WANG et al., 1991) (FIGURA 10). A inibição da ceramida sintetase pela fumonisina B₁ foi observada em estudos realizados em tecidos de fígado de rato (WANG et al., 1991) e em outros diversos tipos celulares (MERRILL JR. et al., 1997).

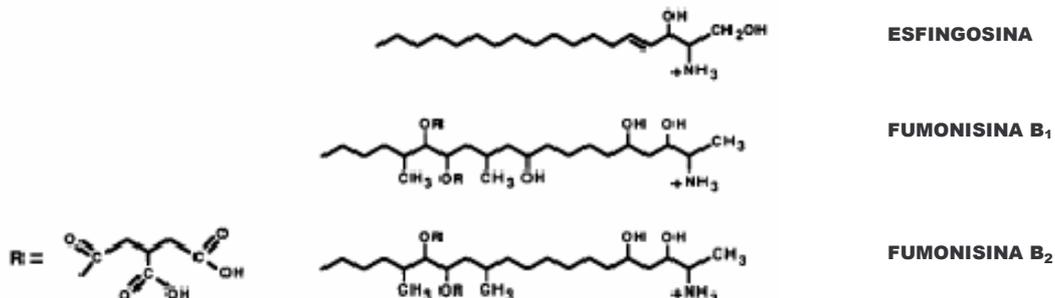


FIGURA 9 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DA ESFINGOSINA E DAS FUMONISINAS FB₁ E FB₂ (WANG et al., 1991).

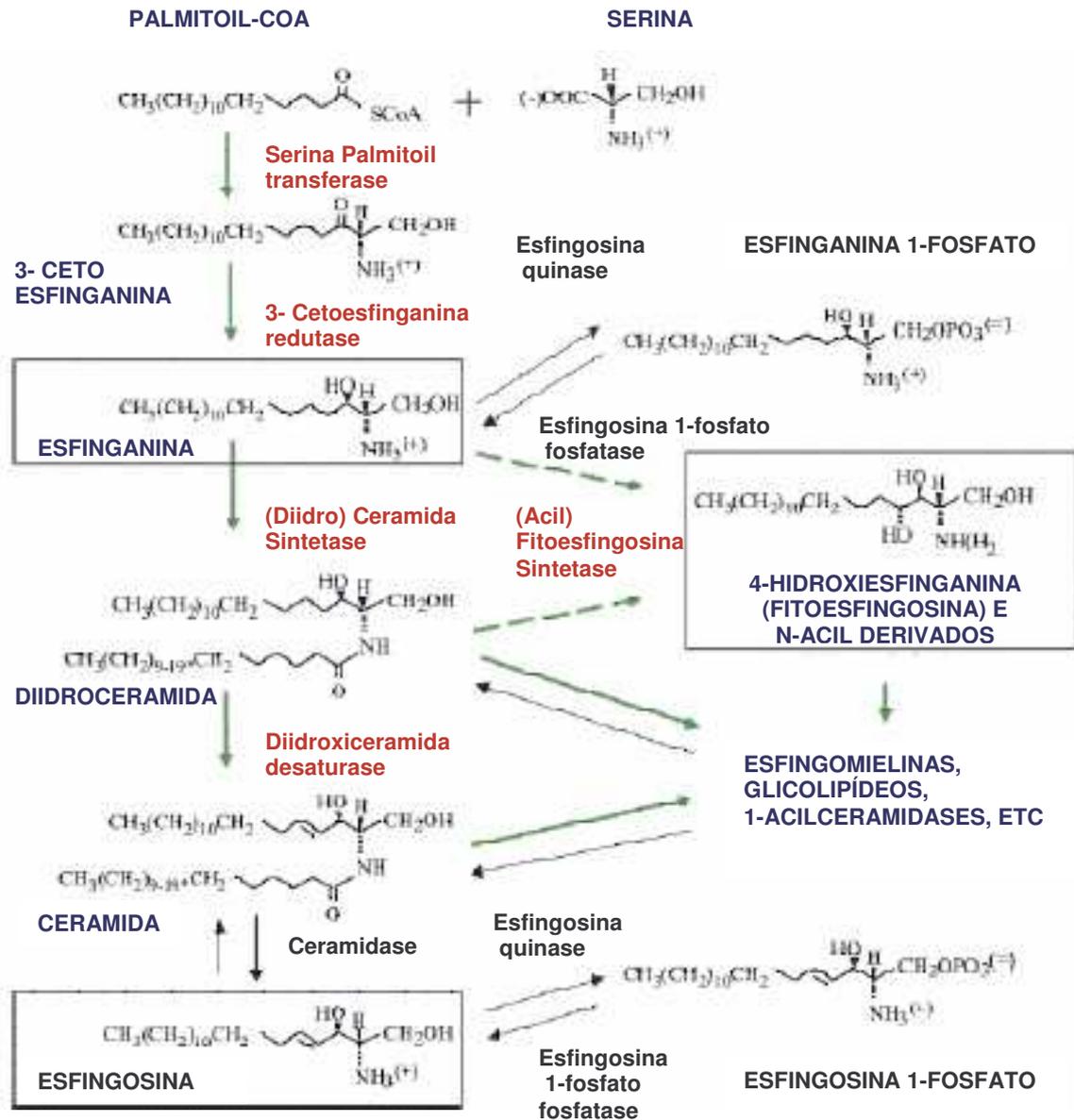


FIGURA 10 – CICLO DE BIOSÍNTESE DAS BASES ESFINGÓIDES (MERRILL JR.,2002)

Os esfingolípídeos, especialmente as esfingomielinas são encontradas em grandes quantidades no cérebro e no tecido nervoso (MURRAY et al., 2002; VOET et al., 1999). As esfingomielinas compõem em grande proporção a bainha de mielina que reveste e isola eletricamente muitos axônios das células nervosas (VOET et al., 1999). Os gangliosídeos são glicoesfingolípídeos mais complexos (MURRAY et al., 2002) considerados os principais componentes das membranas da superfície celular e constituem fração significativa dos lipídeos cerebrais (VOET et al., 1999; MERRILL JR.

et al.,1997). São receptores de certas toxinas protéicas bacterianas e existem evidências de serem determinantes específicos do reconhecimento célula-célula, o que os relaciona ao crescimento e diferenciação celulares e a carcinogênese (HAKAMORI (2002) apud MENALDINO et al., 2003; VOET et al., 1999; IWABUCHI et al.(1998) e RIBONI et al.(1997) apud MERRILL JR. et al, 2001). A esfingomielina, assim como as porções de ceramida dos esfingolipídeos mais complexos, parecem modular especificamente as propriedades proteínas-cinases e proteínas-fosfatases influenciando a regulação do crescimento e a diferenciação celular (VOET et al., 1999, MERRILL JR. et al.,1997). Logo, os esfingolipídeos estão envolvidos nas vias de transdução de sinais que mediam crescimento, diferenciação e apoptose celulares (MERRILL JR. et al., 1997).

Quantidades anormais de esfingolipídeos nos tecidos são características de doenças freqüentemente associadas ao sistema nervoso (MURRAY et al., 2002; MATHEWS & HOLDE, 1990). Em células que se encontram em transformação oncogênica são observadas mudanças significativas no teor de glicolipídeos na superfície das células (MATHEWS & HOLDE, 1990). Estudos *in vivo* associam a alteração no metabolismo dos esfingolipídeos com a toxicidade da fumonisinas ao fígado e rins observados em roedores e animais de criação (RILEY et al., 2001). Em estudo *in vitro* realizado com células humanas de fígado Ehrlich et al. (2002) consideraram que a fumonisina B₁ pode agir como carcinogênico genotóxico em humanos pela observação da formação de micronúcleos.

No ciclo da biossíntese de esfingolipídeos a enzima ceramida transferase catalisa a acilação da esfinganina a esfingosina e a reacilação da esfingosina a ceramida. Na presença da fumonisina, a enzima em questão passa a reconhecer o amino grupo e ácido carboxílico da micotoxina ao invés do amino grupo da base esfingóide esfinganina e o ácido tricarbóxico da acil-CoA-transferase (RILEY et al., 2001). A interrupção do metabolismo dos esfingolipídeos pode levar a alteração da biossíntese de ceramidas, aumento da concentração de bases esfingóides livres e formas 1-fosfato, alteração da concentração celular de glicoesfingolipídeos específicos (RILEY et al., 2001; MERRILL JR. et al., 1997).

Segundo Merrill Jr. et al.(2002) a partir das alterações acima citadas teríamos as seguintes conseqüências: supressão da síntese de bases esfingóides pelo acúmulo das bases esfingóides livres; estimulação do crescimento ou inibição da apoptose em função da maior concentração de esfingosina 1-fosfato; prejuízo de algumas funções de proteínas da membrana celular, como prejuízo do transporte de folatos podendo assim contribuir para doenças do tubo neural devido ao acúmulo de esfinganina que parece estar relacionado à depleção de esfingolípídeos complexos.

Devido à ausência de evidências da reatividade das fumonisinas com o DNA, Riley et al. (2001) consideram que o risco de carcinogênese da fumonisina pode estar relacionado:

- à maior chance de sobrevivência de células que tenham sofrido danos no DNA por outros agentes, já que a alteração do ciclo de biossíntese de esfingolípídeos pelas fumonisinas pode interromper a apoptose celular;
- ao aumento nas chances de sobrevivência de células que já possuíam DNA danificado devido à insensibilidade aos efeitos apoptóticos desencadeada pelo metabolismo de esfingolípídeos;
- à estimulação da divisão celular devido à estimulação da produção de esfingoanina-1-fosfato a partir do acúmulo de esfingosina;
- ao aumento da regeneração celular em resposta ao aumento da taxa de morte celular resultante da depleção dos esfingolípídeos mais complexos.

A relação da biossíntese de esfingolípídeos com a regulação de diversos tipos de enzimas pode explicar outras disfunções. Como exemplos a modificação da atividade de quinases e fosfatases (MERRIL JR. & LIOTTA, 1996) e a alteração de outras vias metabólicas de lipídeos (MERRIL JR. et al., 2001).

Altas concentrações de esfingosinas ou esfinganinas livres nos tecidos, no plasma ou na urina podem ser uma indicação (indicador biológico) da ingestão de fumonisinas por animais e humanos (MERRILL JR., 2002). A partir deste fato Wang et al. (1999) observaram que a inibição da ceramida sintetase é reversível em ratos com a remoção da ingesta de fumonisina B₁, mas não quando se mantinham baixas doses da micotoxina. Merrill Jr. et al.(2001) cogitam que o consumo de fumonisinas em

menores doses, mas em maior frequência possa ser de maior efeito nocivo do que o consumo ocasional de maiores concentrações.

Voss et al. (1996), no intuito de verificar a toxicidade de fumonisinas hidrolisadas, demonstraram que material extraído de culturas de *F. moliniiforme* ou *F. proliferatum* após tratamento de aquecimento em meio alcalino ("nixtamalization") continuou capaz de causar hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em ratos quando comparado ao material extraído das culturas sem o tratamento. Em estudo similar realizado por Hendrich et al. (1993) com milho fermentado por *F. proliferatum*, o milho tratado apresentou maior toxicidade que o milho controle. Isto poderia se explicado pelo fato da ceramida sintetase não conduzir a fumonisina B₁ a acilação, mas o fazer no caso da fumonosina hidrolisada (fração aminopentol) levando a maiores acúmulos de esfinganina quando comparada a fumonisina em mesmas concentrações (HUMPF et al., 1998). Tal fato sugere que a fração aminopentol (AP₁) pode ser mais potente na inibição da ceramida sintetase do que a FB₁ (MERRILL JR. et al., 2001).

Até o momento, as formas N-acetiladas (FIGURA 7) são consideradas menos tóxicas *in vivo* que as fumonisinas do grupo B (JECFA, 2001). Tal observação pode ser justificada pelo fato do grupo amino livre ter importante papel na toxicidade das fumonisinas.

Existe a possibilidade de detoxificação das fumonisinas pela reação das mesmas com açúcares redutores, o que bloquearia a amina primária da molécula (Murphy et al (1996) apud LU et al., 2002). Tal reação é caracterizada como reação de Maillard, reação de escurecimento não enzimático típica de alimentos, na qual açúcares redutores reagem com a amina primária de aminoácidos, peptídeos ou proteínas gerando as melanoidinas que atribuem flavor e coloração característicos (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004). A fumonisina FB₁ modificada pela frutose evita a indução da FB₁ na hepatotoxicidade e promoção de hepatocarcinogênese durante estudo de morte natural de células de fígado em ratos (LU et al.,1997). A velocidade da reação de Maillard seria favorecida, quanto maiores o poder redutor do açúcar e a temperatura de exposição, apresentando-se constante entre temperaturas de 60 a 80°C (LU et al., 2002).

2.2.4 Incidência em alimentos e efeitos na saúde humana

Desde sua descoberta em 1988 na África do Sul, as fumonisinas têm sido encontradas em diversas variedades de milho e seus produtos em países da África (FANDOHAN et al., 2004; MARASAS, 2001; DOKO et al., 1996; DOKO et al., 1995), Ásia (HUSSEIN et al., 2002; LI et al., 2001; SHEPHARD et al., 2000; TSENG & LIU, 1997; UENO et al., 1997), Europa (CASTELLÁ et al., 1999; RITIENI et al., 1997; DOKO et al., 1995) e Américas (BITTENCOURT et al., 2005; VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003; ABBAS et al., 2002; MALLMANN et al., 2001; MAZZANI et al., 2001; MEDINA-MARTÍNEZ et al., 2000; DOMBRINK-KURTZMAN et al., 1999; MAGNOLI et al., 1999; VIQUEZ et al., 1996).

Estudo realizado por Sydenham et al. (1990a) analisou uma amostra de milho mofado da safra de 1978 coletada em Transkei, África do Sul, em área de alto índice de câncer de esôfago (CE). Foi detectada a presença de FB₁ a partir de três diferentes metodologias utilizadas (HPLC / UV, HPLC / Fluorescência, GC - MS). A mesma amostra, avaliada em estudos anteriores, estava contaminada com pelo menos quatro tipos de micotoxinas de *Fusarium* (moniliformina, zearalenona, desoxinivalenol e fusarina C).

Luo et al. (1990) evidenciaram a presença natural de micotoxinas de *Fusarium* (tricotocenos e zearalenona) em amostras de milho e trigo em áreas de baixo e alto risco de CE na China, não conseguindo estabelecer relação entre as micotoxinas pesquisadas e a incidência de CE.

Em segundo trabalho realizado por Sydenham et al. (1990b), amostras de milho da safra de 1985 oriundas de Distritos de Trankei, África do Sul, pertencentes a áreas de baixa e alta incidência de CE foram analisadas. As amostras relacionadas às áreas de alta incidência apresentaram maior contaminação por *F. moliniforme* no exame micológico do que as amostras das áreas de baixa incidência. Nas amostras de milho mofado foram encontradas outras micotoxinas produzidas pelo gênero *Fusarium*. Mesmo assim, foi possível associar as baixas concentrações de fumonisinas (FB₁ e FB₂) encontradas com áreas de baixa incidência de CE e as maiores concentrações de fumonisinas (FB₁ e FB₂) encontradas com áreas de alta incidência de CE.

Bragagnolo et al. (1994) mostraram uma correlação das concentrações de fumonisinas B₁ e B₂ encontradas por Thiel et al. (1992) em amostras de milho saudável e milho mofado colhidas em áreas de incidência de CE em Transkei (TABELA 1), relacionando níveis altos de fumonisinas B₁ e B₂ com áreas de alto índice de CE em humanos.

TABELA 1 – CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS EM ÁREAS DE CÂNCER DE ESÔFAGO EM TRANSKEI, ÁFRICA DO SUL.

Milho	Ano	Nº de Amostras	Áreas	Fumonisinas (µg /g)	
				FB ₁	FB ₂
Saudável	1985	12 em cada	A	0 - 0,6	0 - 0,2
			B	0,05 - 7,9	0 - 2,2
	1989	8	A	0 - 3,3	0 - 1,0
		6	B	0 - 5,4	0 - 1,3
Mofado	1985	12 em cada	A	0,5 - 18,9	0,2 - 6,8
			B	3,4 - 46,9	0,9 - 16,3
	1989	8	A	0,1 - 11,3	0 - 3,7
		6	B	3,0 - 117,5	0,8 - 23,0

FONTE: THIEL et al (1992) apud BRAGAGNOLO & TOLEDO, 1994, p.157

A = baixa incidência de câncer de esôfago

B = alta incidência de câncer de esôfago

Na China, Yoshizaya et al. (1994) encontraram uma correlação positiva entre concentração de fumonisinas em amostras de milho de áreas de alta incidência de CE. Embora as concentrações encontradas nestas regiões fossem inferiores as encontradas em regiões de alto risco de Transkey, África do Sul, elas eram similares às encontradas em produtos para consumo humano nos EUA (SYDENHAM et al., 1991) e Suíça (PITTET et al., 1992). Altas concentrações de fumonisinas foram encontradas no Iran em área de alta incidência de CE, em níveis de contaminação similares às encontradas em áreas identificadas como de alta incidência de CE em Transkei, África, na Carolina do Sul, EUA e Itália (SHEPHARD et al., 2000).

Ueno et al. (1997) consideram a partir das concentrações de fumonisinas encontradas em milho nas áreas de incidência de câncer de fígado na China e de sua co-ocorrência com aflatoxinas e alta incidência de Hepatite B que as fumonisinas juntamente com tricotocenos em alimentos e microcistinas, toxinas oriundas de algas azul-esverdeadas, na água podem atuar como promotores de hepatocarcinogênese. A hipótese está associada ao fato das fumonisinas terem sido identificadas como

promotoras de hepatocarcinogênese em ratos. Ao pesquisarem dados dos últimos vinte anos a respeito de toxicantes oriundos de alimentos contaminados por fungos e poluição da água por algas encontrados em áreas identificadas como de alta incidência de câncer de fígado observaram a correlação com a presença de aflatoxina B₁ (AFB₁) e microcistinas. Ao comparar áreas de alta e baixa incidência de câncer de fígado foi mostrado que as médias das concentrações de AFB₁ não eram significativamente diferentes. Enquanto isso, para fumonisinas (FB₁ + FB₂ + FB₃), dependendo da safra avaliada, eram observadas diferenças de até 31 vezes da área de alta incidência para a de baixa incidência. Outros fatores que reforçam esta associação: em 1993 as amostras apresentaram soma das médias de fumonisinas de 8,25 mg.kg⁻¹; a maior participação do milho na alimentação básica nas áreas de alta incidência de câncer de fígado (70% enquanto para áreas de baixa incidência, 20%); as áreas de alta incidência de câncer primário de fígado apresentavam condições climáticas favorecedoras ao crescimento de fungos.

2.3 FUMONISINAS EM PRODUTOS A BASE DE MILHO

Sydenham et al. (1991) analisaram 124 amostras de produtos comerciais a base de milho adquiridos no varejo de cinco países: África do Sul, Canadá, Egito, EUA e Peru com intuito de verificar a concentração de fumonisinas em produtos destinados à alimentação humana. As TABELAS 2.1 e 2.2 apresentam um resumo das contaminações por fumonisinas encontradas em alimentos a base de milho destinados à alimentação humana em vários países reportadas por vários autores.

No Brasil, a pesquisa de fumonisinas em milho iniciou-se devido às perdas econômicas relacionadas aos surtos de leucoencefalomalácia (LEM) associados à ingestão de milho mofado (BRAGAGNOLO & TOLEDO, 1994; SYDENHAM et al., 1992b). Resultados destes trabalhos podem ser verificados na TABELA 3.

TABELA 2.1 – CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS ENCONTRADAS EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO DESTINADOS A ALIMENTAÇÃO HUMANA NO MUNDO.

Referência (Método)	País	Alimento	Nº de Amostras	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)		FB ₂ (mg.kg ⁻¹)		Incidência* (nº positivas / total)
				Intervalo	Média das Positivas	Intervalo	Média das Positivas	
Sydenham et al., 1991 (HPLC / Fluorescência)	África do Sul	Fubá	52	nd - 0,47	0,13	nd - 0,13	0,08	46/52
		Canjica	18	nd - 0,19	0,12	nd - 0,12	0,08	10/18
		Cornflakes	3	nd	nd	nd	nd	0/3
		Outros	8	nd - 0,09	0,08	nd	nd	2/8
	Canadá	Fubá	2	nd - 0,05	0,05	nd	nd	1/2
	Egito	Fubá	2	1,78 - 2,98	2,38	0,47 - 0,78	0,595	2/2
	EUA	Fubá	16	nd - 2,79	1,04	nd - 0,92	0,29	15/16
		Canjica	10	0,10 - 2,54	0,61	nd - 1,06	0,37	10/10
		Cornflakes	2	nd	nd	nd	nd	0/2
		Outros	7	0,08 - 0,7	0,40	nd - 0,24	0,14	5/7
Peru	Fubá	4	nd - 0,66	0,66	nd - 0,13	0,13	1/4	
Pittet et al., 1992 (HPLC / Fluorescência)	Suíça	Semolina de milho	55	nd - 0,79	0,26	nd - 0,16	0,10	34/55
		Cornflakes	12	nd - 0,05	0,05	nd	nd	1/12
		Fubá	7	nd - 0,11	0,08	nd	nd	2/7
		Milho Doce	7	nd - 0,07	0,07	nd	nd	1/7
		Outros (amido de milho, pipoca, tortilhas, biscoito e macarrão)	17	nd	nd	nd	nd	0/17
Doko et al., 1996 (HPLC / Fluorescência)	Diferentes Países do leste e do sul da África	Fubá	4	0,03 - 0,35	0,18	nd - 105	0,08	4/4
			2	0,06 - 0,07	0,06	nd	nd	2/2
			1	0,74	0,74	0,38	0,38	1/1
			4	0,05 - 1,91	0,62	nd - 0,62	0,38	4/4

NOTA: nd = não detectada. * incidência de pelo menos uma das fumonisinas.

TABELA 2.2 – CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS ENCONTRADAS EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO DESTINADOS A ALIMENTAÇÃO HUMANA NO MUNDO.

Referência (Método)	País	Alimento	Nº de Amostras	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)		FB ₂ (mg.kg ⁻¹)		Incidência (nº positivas / total)
				Intervalo	Média das Positivas	Intervalo	Média das Positivas	
Tseng & Liu, 1997 (HPLC / Fluorescência)	Taiwan	Snacks	78	nd – 2,39	0,45 ± 0,06	nd - 0,71	0,14 ± 0,02	26/78
		Milho doce enlatado	24	nd – 1,08	0,40 ± 0,03	nd - 0,65	0,06	12/24
		Pipoca	22	nd – 1,00	0,34 ± 0,07	nd - 0,27	0,15 ± 0,02	7/22
		Cornflakes	17	0,14 – 1,28	0,49 ± 0,07	0,12 - 0,46	0,16 ± 0,02	4/17
		Canjica	4	nd	nd	nd	nd	0/4
		Creme de milho	2	nd – 0,60	0,60	nd	nd	1/2
		Outros	6	nd – 0,07	0,05	nd	nd	2/6
Piñero et al., 1977 (HPLC / Fluorescência)	Uruguai	Polenta	8	nd – 0,42	0,17	nd	nd	3/8
		Amido	4	nd	nd	nd	nd	0/4
		Pipoca	2	nd – 0,19	0,19	nd	nd	1/2
		Snacks	5	nd – 0,31	0,23	nd	nd	2/5
		Cornflakes	3	nd – 0,21	0,21	nd	nd	1/3
		Milho congelado	2	nd – 0,11	0,11	nd	nd	1/2
		Milho enlatado	4	nd	nd	nd	nd	0/4
Dejardins et al., 2000	Nepal	Creme de milho	8	Intervalo**: nd – 2,40		Média das Positivas**: 0,80		6/8
		Cornflakes	2	Intervalo**: nd		Média das Positivas**: nd		0/2
Cirillo et al., 2003 (HPLC/MS)	Itália	Pipoca, farinha, cuzcuz, polenta, biscoitos e matinais	27 (produtos convencionais)	0,02 - 2,16	0,34	0,01 – 0,40	0,02	30%
			27 (produtos orgânicos)	0,01 – 0,60	0,18	0,03 – 0,15	0,12	44%

NOTA: nd = não detectada. * incidência de pelo menos uma das fumonisinas. ** Soma das fumonisinas (FB₁ + FB₂ + FB₃) em mg.kg⁻¹.

TABELA 3 – CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS EM MILHO DAS SAFRAS 1990-1991 NO ESTADO DO PARANÁ.

Região	Nº de Amostras	Fumonisinas (mg.kg ⁻¹)	
		FB ₁	FB ₂
Norte	27	1,66 -12,55	1,20 -10,24
Centro - oeste	3	2,96 -3,89	2,17 – 2,78
Centro - leste	7	0,60 – 6,98	0,0 – 4,79
Central	2*	5,54	5,09

FONTE: YAMAGUSHI et al (1992) apud BRAGAGNOLO & TOLEDO, 1994, p.155;

NOTA: * 1 amostra foi negativa

De um total de 195 amostras de milho híbrido recém colhido e armazenado dos Estados de Minas Gerais e São Paulo, analisadas por Orsi et al (2000) (65 delas originadas de três tipos diferentes de híbridos), 176 (90.2%) estavam contaminadas com FB₁ em concentrações de 0.87±49.31 mg.kg⁻¹ e 190 (97.4%) contaminadas com FB₂ em concentrações de 1.96±29.16 mg.kg⁻¹.

No Estado de São Paulo, milho recém colhido das safras de 1997 e 1998 provenientes das cidades de Capão Bonito, Ribeirão Preto, Votuporanga e São Paulo apresentaram concentrações de fumonisinas compatíveis com as encontradas em milho para consumo humano em Transkei, África (SYDENHAM et al. 1990b), em áreas de alta incidência de CE. As amostras contaminadas avaliadas apresentaram concentrações de FB₁ de 1,63 a 25.69 mg.kg⁻¹ com média de 5,61 mg.kg⁻¹ e de FB₂ de 0.38 a 8.60 mg.kg⁻¹ com média de 1,86 mg.kg⁻¹ (CAMARGOS et al., 2000). Ainda no Estado de São Paulo (ALMEIDA et al. 2002) das 26 amostras de milho do município de Capão Bonito (safras de 1998 e 1999) analisadas, 23 (88.5%) estavam contaminadas com FB₁ numa concentração de 0.09 a 10.87 mg.kg⁻¹, e 14 (53.8%) estavam contaminadas com FB₂, numa concentração de 0.05 to 0.52 mg.kg⁻¹. Em Ribeirão Preto, de um total de 31 amostras, 29 (93.5%) estavam contaminadas com FB₁ de 0.11 a 17.69 mg.kg⁻¹ e 19 (61.3%) estavam contaminadas com FB₂ de 0.05 a 5.24 mg.kg⁻¹.

Em São Paulo (BITTENCOURT et al., 2005) 30 amostras de fubá e 30 de creme de milho coletadas de julho a setembro de 2000 apresentaram contaminação por FB₁ e FB₂ em concentrações de 1.1 a 15.3 mg/ kg e 0.2 a 3.9 mg/ kg respectivamente. A concentração média de FB₁ foi de 5.2 ± 3.7 mg/ kg e de FB₂ de 1.0

± 0.9 mg/ kg. Não foram detectadas as micotoxinas aflatoxinas B₁, B₂, G₁, e G₂ nas amostras avaliadas.

Dos 81 produtos de milho coletados em 1999 em Campinas, São Paulo, 40 estavam contaminados por FB₁ e 44 por FB₂ com variações e médias respectivas de 0,03 a 4,93 mg.kg⁻¹ e média de 1,18 mg/ kg, de 0,02 a 1,38 mg/ kg e média de 0.29 mg/ kg (MACHINSKI JR. et al. (2000) apud RODRÍGUEZ & SABINO, 2002).

A TABELA 4 apresenta as contaminações encontradas em produtos de milho em estudos realizados no Brasil por Machinsky Jr. & Soares (2000) e Bittencourt et al. (2004).

TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS ENCONTRADAS EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO DESTINADOS A ALIMENTAÇÃO HUMANA NO BRASIL.

Referência (Método)	Cidade e Estado	Alimento	Nº de Amostras	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)		FB ₂ (mg.kg ⁻¹)		Incidência (nº positivas / total)
				Intervalo	Média das Positivas	Intervalo	Média das Positivas	
Machinski Jr. & Soares, 2000	Campinas - SP	Fubá	9	0.56 - 4.93	-	-	-	9/9
		Milho Degerminado	11	nd – 4,52	-	-	-	8/11
		Crème de milho	11	nd - 1.46	-	-	-	9/11
		Farinha de milho pré-cozida	6	nd - 1.79	-	-	-	4/6
		Canjica	2	0.17 -1.23	-	-	-	2/2
		Pipoca	9	nd-1.72	-	-	-	4/9
		Cornflakes	4	nd - 0.66	-	-	-	1/4
		Farinha de Cereais para Bebê	2	nd e 0.44	-	-	-	1/2
		Milho em Espiga	7	nd	-	--	-	0/7
		Pamonha	7	nd	-	-	-	0/7
		Curau	2	nd	-	-	--	0/2
		Milho Doce Enlatado	11	nd – 0,08	-	-	-	2/11
Bittencourt et al., 2004	São Paulo - SP	Fubá	30	1,08 – 15,29	5,17 ± 3,68	0,23 – 3,94	1,00 ± 0,87	30/30
		Creme de milho	30	0,47 – 7,20	2,11 ± 1,51	0,12 – 1,76	0,67 ± 0,46	30/30

NOTA: nd = não detectada. * incidência de pelo menos uma das fumonisinas.

2.4 CONTROLE DA INGESTÃO HUMANA DE FUMONISINAS NA DIETA

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer em Lyon, França, classificou as toxinas produzidas por *F.moniliforme* como possíveis carcinogênicos em humanos (MARASAS, 2001; IARC, 1993). Tal classificação é definida pela International Agency for Research on Cancer (IARC) como pertencente ao grupo 2B: “O agente (mistura) é um possível carcinogênico em humanos”, isto é, há limitada evidência de carcinogenicidade em humanos e evidências suficientes de carcinogenicidade em animais experimentais.

De Nijs (1998) calculou que metade da população da Holanda estava exposta a 1,0 µg de FB1 e FB2 por dia em sua dieta (MIDIO et al., 2000). A Suíça nesta época era o único país a estabelecer um limite máximo de fumonisinas em milho e seus produtos, de 1 mg.kg⁻¹ (BOUTRIF & CANET (1998) apud MIDIO et al., 2000).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) fixou em fevereiro de 2001 o limite de 2 µg/kg de peso corporal ao dia como ingestão diária tolerável máxima temporária (FAO / WHO, 2002).

Food and Drug Administration (FDA, 2001_a) apresenta um “Guia para Indústrias”, no qual sugere concentrações máximas (FB₁ + FB₂ + FB₃) recomendáveis para diferentes produtos de milho: 2 mg.kg⁻¹ para produtos de milho seco degerminado (flocos de milho, querela de milho, fubá, creme de milho com menos de 2,25% de matéria gorda sobre peso seco) e 4 mg.kg⁻¹ para outros produtos (flocos de milho, querela de milho, fubá, creme de milho com 2,25% de matéria gorda ou mais sobre peso seco, milho beneficiado para produção e milho para pipoca). Tais recomendações levam em consideração as concentrações de fumonisinas que poderiam ser encontradas considerando Boas Práticas de Produção, que garantem a qualidade do produto agropecuário obtido, e Boas Práticas de Fabricação, que asseguram que produtos, pessoal, instalações e todo o meio envolvido na produção estejam monitorados e controlados, visando o menor risco possível de contaminação.

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo (ABIMILHO, 2003), e a região sul do País é a responsável por grande parte desta produção (CONAB, 2005). Uma considerável porção da safra de milho é produzida por pequenos fazendeiros, e aproximadamente 25% da colheita consumida por eles próprios (PEDROSA & DEZEN, 1991; apud ORSI et al., 2000). A concentração de fumonisinas em milho no estado de

Santa Catarina é similar às maiores concentrações encontradas em regiões do mundo com alto índice de CE (VAN DER WESTHUIZEN et al. 2003). O Rio Grande do Sul possui a maior incidência de câncer de esôfago (CE) no País numa taxa de 18/100.000 (INCA, 2004). As maiores áreas rurais de incidência possuem concomitantemente o maior consumo de milho (VAN DER WESTHUIZEN et al. 2003).

Estudo referente a amostras da safra de 2000 de Santa Catarina demonstrou provável consumo superior a 1,6 µg/kg de peso corpóreo (VAN DER WESTHUIZEN et al. 2003), bem próximo do valor máximo de tolerância diária provisória recomendada pelo Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2001), de 2 µg / kg de peso corpóreo.

A ingestão diária provável de fumonisinas por meio do consumo de alimentos em São Paulo foi de 0,9 µg / kg de peso corpóreo para a área urbana, e de 2,9 µg/kg de peso corpóreo para a área rural (BITTENCOURT et al., 2005). Desta forma a população da área rural estaria sujeita a uma ingestão de fumonisinas superior a recomendada pelo JECFA (2001).

2.5 METODOLOGIA DE ANÁLISE PARA FUMONISINAS EM ALIMENTOS

Os métodos para determinação de fumonisinas em alimentos utilizados atualmente incluem cromatografia de camada delgada, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) (WHO, 2000; DUNCAN et al., 1998). A escolha da metodologia é baseada em fatores como tempo disponível para análise, preço de equipamentos, sensibilidade e resolução necessárias (DUNCAN et al., 1998).

Na aplicação de HPLC para alimentos, as amostras devem passar por tratamentos específicos antes da fase de separação e quantificação para que as mesmas estejam livres de interferentes, não danifiquem a coluna e sejam compatíveis com o eluente a ser utilizado (LANÇAS, 2004; CASS & DEGANI, 2001). As amostras classificadas como sólidas e semi-sólidas devem ser reduzidas (abertas) depois de devida amostragem. O analito é extraído da matriz por meio de um ou de combinação de solventes, separado do restante por filtração, centrifugação ou outros métodos. O

extrato contendo o analito passa por etapa de purificação ou “clean up” para eliminação de interferentes e concentração do analito (quando necessário). A segunda fase de extração (clean up) pode ser realizada por extração líquido-líquido ou extração em fase sólida (CASS & DEGANI et al., 2001).

2.5.1 O Processo de Extração e Clean Up

A maioria dos estudos tem empregado a extração de fumonisinas em milho com solução metanol-água, limpeza do extrato com cartuchos de separação em fase sólida (SPE) SAX, SPE C₁₈ ou cartuchos de imunoafinidade, empregando HPLC / fluorescência para quantificação (FAO/OMS/PNUMA, 1999), e quantifica as fumonisinas FB₁, FB₂, FB₃ e produtos de hidrólise. A quantificação de FB₃ é limitada pela disponibilidade de seu padrão (JECFA, 2001).

No primeiro estágio na etapa de “clean up” do extrato da amostra (FIGURA 11) procura-se a interação do soluto com a coluna, e após a lavagem que irá eliminar os interferentes, extrai-se o soluto com solvente ou mistura de solventes de maior afinidade pelo material de interesse. Desta forma além de evitar a presença de interferentes na cromatografia pode-se garantir a longevidade das colunas analíticas e evitar constantes limpezas do sistema de injeção do HPLC (LANÇAS, 2004).

As colunas SPE possuem um mecanismo de separação similar à coluna de cromatografia líquida e diferenciam-se principalmente pelo grupo ligado ao sorbente que irá interagir com o soluto a ser isolado e pela forma de interação deste soluto com a SPE (LANÇAS, 2004).

A SPE Strong Anion Exchange (SAX) possui ligada à sílica uma amina quaternária (FIGURA 12) que funciona como trocador forte de ânion retendo compostos ácidos do extrato da amostra aplicado. A separação do analito pode ser influenciada pelo pH, seletividade do contra-íon, pela força iônica, pelo solvente e pelo fluxo aplicado. A retenção é feita pela ionização do composto e para eluir aplica-se solvente que venha a atribuir pH inferior ao pK_a favorecendo a forma não ionizada do analito (LANÇAS, 2004). As fumonisinas são retidas na coluna pelos grupos de ácidos tricarbóxicos que interagem com os grupos aniônicos.

a grupos de menor tamanho, como C_8 . Para a interação do analito com a coluna deve-se trabalhar com solventes polares e pHs mais elevados que garantam uma menor ionização da molécula e o maior caráter apolar (LANÇAS, 2004; CIOLA, 1998). Na fase de eluição do analito emprega-se solvente apolar (LANÇAS, 2004).

Na quantificação de fumonisinas, as colunas SPE SAX proporcionam uma maior purificação do extrato quando comparada a C_{18} (SHEPHARD, 1998; BENNETT et al., 1994). A SAX não pode ser utilizada para determinação da fração aminopoliol da fumonisina hidrolisada, para tal são utilizadas as SPE C_{18} (SHEPHARD, 1998; STACK; 1998). Möller & Gustavsson (2000) sugerem que para amostras de milho congelado ou em conserva utilize-se além do clean up com a SPE SAX um clean up complementar com a SPE C_{18} como medida de prevenir picos largos de interferentes no cromatograma. Para a aplicação de colunas de imunoafinidade na determinação de fumonisinas cuidados devem ser tomados com relação à capacidade limitada do ligante (SHEPHARD, 1998).

2.5.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Resolução

A cromatografia é um método físico-químico de separação que se fundamenta na separação diferencial de componentes de uma mistura devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis. Na cromatografia líquida a fase móvel é um líquido e a estacionária, sólida ou líquida (CASS & DEGANI, 2001).

A eficiência da cromatografia líquida está diretamente relacionada com o tamanho e uniformidade das partículas da fase sólida. Com a evolução da cromatografia líquida, são utilizadas partículas da fase sólida de menor diâmetro (micropartículas de 10, 5 ou 3 μm) e regulares (esféricas) e aplicadas bombas para eluição da fase móvel, método este chamado de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE / HPLC). HPLC é uma técnica de melhor performance em termos de resolução, quantificação e detecção em um menor tempo de análise quando comparada a cromatografia líquida clássica (SKOOG et al., 2002; CASS & DEGANI, 2001; CIOLA, 1998).

A estrutura básica da instrumentação para HPLC (FIGURA 13) consiste em uma fase móvel, composta por um ou mais solventes, que é bombeada em fluxo de

0,1 a 10 mL/min., a pressão constante de até 6.000 psi (libras/polegada²), até a coluna onde ocorre a separação dos constituintes da amostra. A amostra é inserida no injetor através de uma seringa (volumes de 2 a 100 μ L, aproximadamente) localizado em posição anterior à coluna. Após a separação, as substâncias separadas passam por um detector que gera resultados de acordo com o princípio de detecção do aparelho empregado. O resultado, em tempo de retenção e quantidade das substâncias, são traduzidos na forma de cromatograma por um registrador (SKOOG et al., 2002; CASS & DEGANI, 2001).

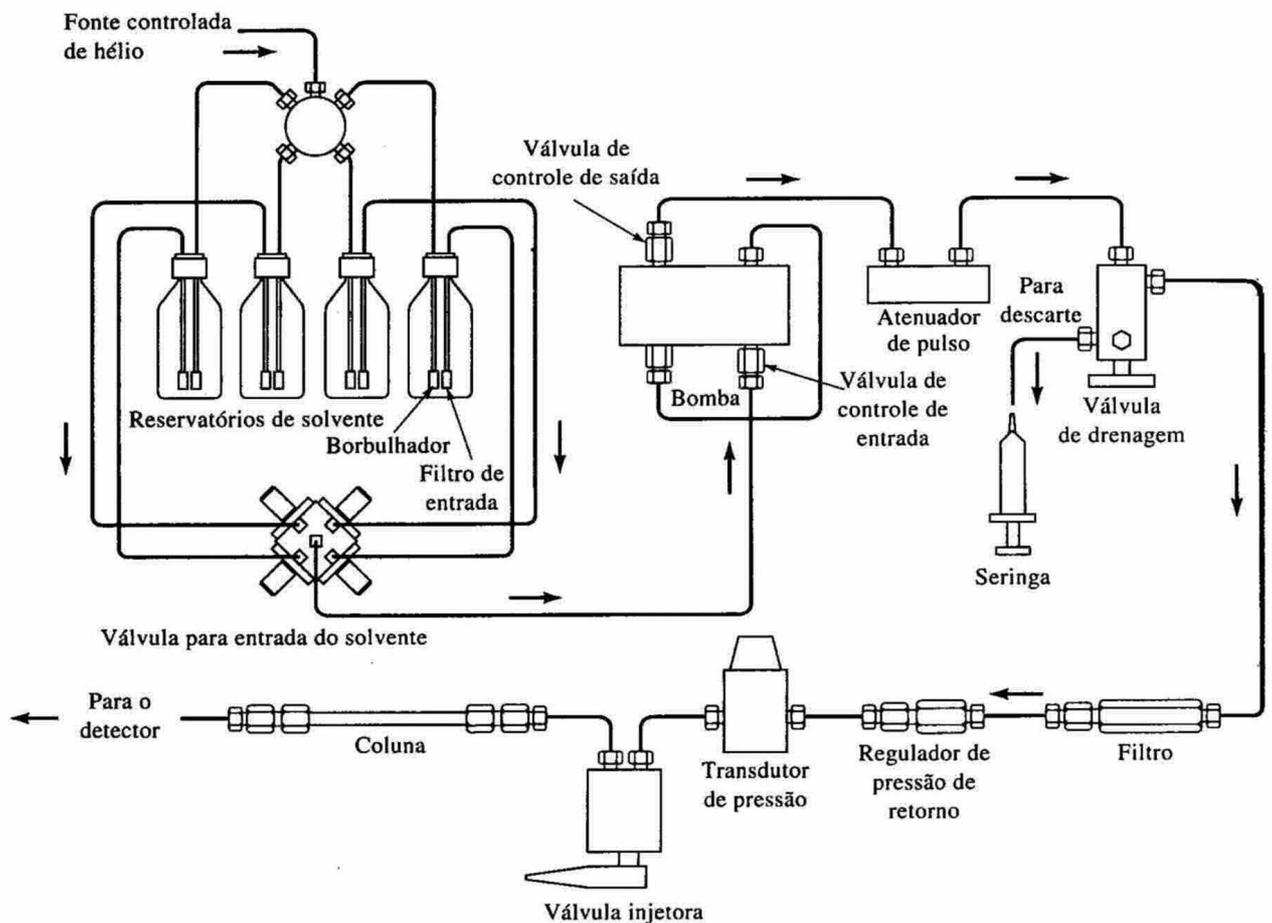


FIGURA 13 – ESQUEMA BÁSICO DE UM EQUIPAMENTO (SKOOG et al., 2002).

A coluna cromatográfica no HPLC desempenha o papel de fase estacionária da cromatografia líquida. Geralmente é constituída de partículas de sílica que podem ter sua superfície modificada por derivação química (CASS & DEGANI, 2001; CIOLA,

1998). A sílica gel não deve ser utilizada em cromatografia cuja fase móvel é aquosa, pois ocorre uma forte interação do solvente com os grupos silanóis³ da sílica o que causa a desativação da sílica diminuindo a eficiência na separação de compostos polares (CASS & DEGANI, 2001). As modificações na superfície da sílica levam a obtenção de fases estacionárias com diferentes mecanismos de separação, mais estáveis, eficientes e reprodutíveis, e que são as mais utilizadas atualmente (CASS & DEGANI, 2001; CIOLA 1998). Para a cromatografia de modo reverso ou normal⁴ são utilizados organosilanos que apresentam como cadeia lateral grupos octadecil (C₁₈), octil (C₈) e propil, entre outros (CASS & DEGANI, 2001).

Na separação pelo modo reverso ou normal, a interação do soluto com a fase estacionária permanece constante, logo, a retenção é determinada pela composição da fase móvel. No modo normal a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, os solventes utilizados são normalmente uma mistura de solventes orgânicos sem a adição de água e as moléculas hidrofóbicas são eluídas primeiro. No modo reverso a fase estacionária é menos polar que a fase móvel, aquosas, permitindo a separação de uma grande variedade de solutos levando assim a sua maior utilização em HPLC. Os solventes utilizados devem ser miscíveis com água e neste caso o mais utilizado é a acetonitrila podendo ser substituída por metanol ou tetraidrofurano. Como a separação se dá pela repulsão do soluto pela fase móvel, trabalha-se com a força inerente ao solvente orgânico usado e sua proporção com relação à água (FIGURA 14). Quanto menor a polaridade do solvente, maior será a sua força (CASS & DEGANI, 2001).

Para obtenção de cromatogramas de boa resolução, o que significa uma relação ideal entre separação de solutos e a definição das bandas cromatográficas, é necessária a definição da força do solvente, da sua proporção em relação à água, fluxo do gradiente de solventes com relação à característica de interação da coluna cromatográfica influenciada pelo tamanho das partículas e diâmetro de poro que a

³ A sílica é um polímero composto por átomos tetraédricos de silício conectados entre si por átomos de oxigênio (ligações siloxano, Si-O-Si), tendo grupos silanóis (Si-OH) de diferentes tipos em sua superfície (CASS, 2001).

⁴ A separação cromatográfica pode ser classificada por diferentes modos de interação do soluto: cromatografia em fase reversa, cromatografia em fase normal, por pareamento de íons ou por troca iônica e por exclusão (CASS & DEGANI, 2001; CIOLA, 1998).

constituem e de seu comprimento (SKOOG et al., 2002; CASS & DEGANI, 2001; CIOLA, 1998).

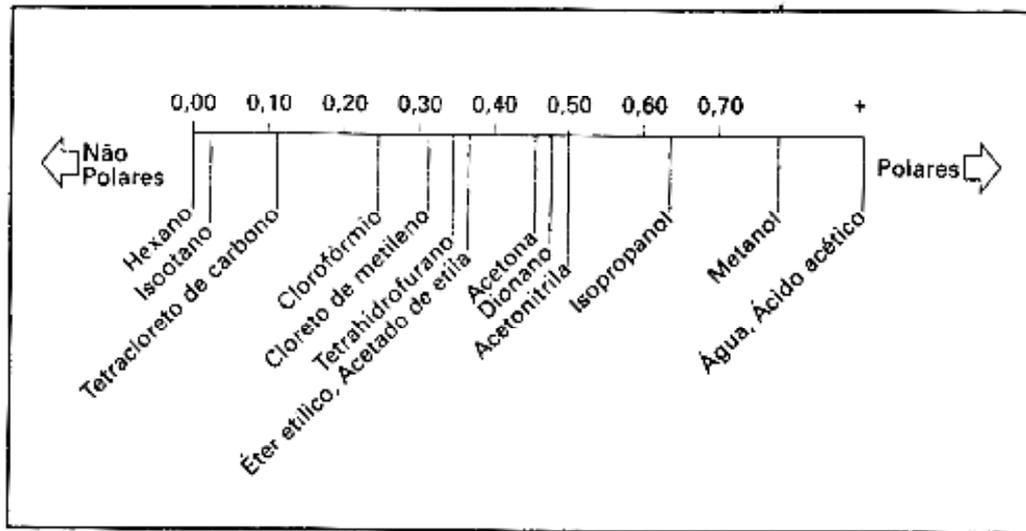


FIGURA 14 – POLARIDADE DOS SOLVENTES (CIOLA, 1998).

O diâmetro de poro médio da coluna para substâncias de baixo peso molecular (inferior a 2.000) deve ser maior que o diâmetro molecular do composto estudado (entre 50 e 250 Å) enquanto para a análise de polímeros de alto peso molecular o diâmetro deverá ser maior (500 a 4.000 Å) (CIOLA, 1998).

A eficiência da coluna cromatográfica depende da técnica de empacotamento da fase estacionária e principalmente da sua granulometria. Geralmente quanto menor a granulometria melhor a eficiência da coluna e mais curta será a coluna. Colunas de 3 a 10 cm apresentam partículas de 3 micra e colunas de 10 a 25 cm partículas de até 7 e 10 micra (CIOLA, 1988). A maioria das colunas para cromatografia líquida apresenta comprimento que varia no intervalo de 10 a 30 cm e diâmetro interno que varia de 4 a 10 mm. Colunas de alta velocidade e de alta eficiência podem ter dimensões menores que estas (3 a 7,5 cm) e estão empacotadas com partículas e 3 a 5 µm (SKOOG et al., 2002).

Na análise de fumonisinas por HPLC são empregados detectores de fluorescência. O princípio destes detectores é a emissão de energia fluorescente por um soluto excitado por radiação UV. A fluorescência é característica de algumas moléculas que quando sofrem excitação perdem parte da energia indo ao mais baixo nível vibracional do estado excitado. A fluorescência é a energia restante perdida pela

emissão de um fóton. O detector de fluorescência é um detector mais sensível que o UV (absorção) já que opera com a emissão de luz. Trabalha com a seleção de dois comprimentos de onda, um de absorção, para excitação das moléculas e outro de emissão para detecção da fluorescência (CASS & DEGANI,2001).

As fumonisinas não possuem característica cromófora ou fluorescente. Na detecção destas substâncias por fluorescência torna-se necessária uma reação de derivação para obtenção de material fluorescente. Para tal derivação empregam-se reações pré-coluna cromatográfica que envolvem a amina primária da micotoxina (CASS & DEGANI, 2001; SHEPHARD, 1998).

O método original de quantificação de fumonisinas para HPLC foi desenvolvido por Shephard et al (1990) e aperfeiçoado por Sydenham et al (Sydenham et al., 1992; Shephard et al., 1990). Este foi adotado como método oficial para determinação de fumonisinas FB₁, FB₂ e FB₃ em milho pela Association of Analytical Chemistry (AOAC) (SHEPHARD, 1998).

A técnica de Shephard et al (1990) emprega clean up com SPE SAX, derivação com o-ftaldialdeído (OPA), separação de fase reversa e detector de fluorescência, e resulta em 99,5% e 85,9% de recuperação e limites de detecção de 50 ng.g⁻¹ e 100 ng.g⁻¹ para FB₁ e FB₂ respectivamente. Em 1992, Sydenham et al. aplicaram este método para a análise de FB₃. Ware et al. (1993) apresentam uma modificação da metodologia, utilizando a derivação da fumonisina FB₁ com 2,3 – dicarboxialdeído naftaleno (NDA). Outras substâncias podem ser utilizadas para a derivação, mas as mais empregadas são o OPA e o NDA (TABELAS 5.1 a 5.3).

A derivação com o OPA (FIGURA 15) e 2-mercaptoetanol é rápida e reproduzível em temperatura controlada e em tampão borato (pH 9-10), mas o método sofre desvantagens devido à limitada estabilidade do produto fluorescente formado (SHEPHARD,1998). Williams et al. (2004) estudando a estabilidade do derivado OPA-FB₁, reportou que o produto fluorescente é estável em temperatura ambiente até 4 minutos após seu preparo, destacando que após 8 minutos há uma redução de 5% de fluorescência do composto, e após 64 minutos uma redução de 52%. Os mesmos autores sugerem que o derivado de OPA seja estocado a temperatura de 4 °C para

garantir maior estabilidade do composto e maior reprodutibilidade experimental do método.

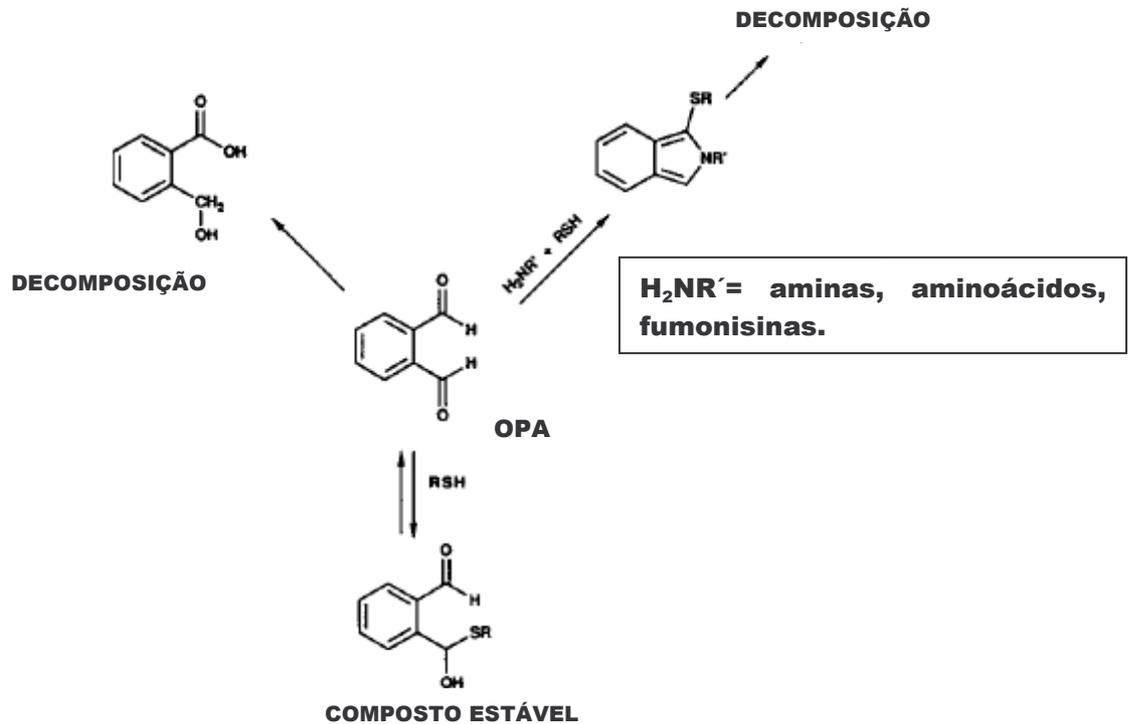


FIGURA 15 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DA REAÇÃO DO OPA COM 2-MERCAPTOETANOL (RSH) E H₂NR' (aminoácidos ou fumonisinas) PARA DETECÇÃO POR HPLC / FLUORESCÊNCIA (DORRESTEIJN et al., 1996).

As derivações com NDA (FIGURA 16) formam composto de maior fluorescência e relativamente estáveis por mais de 24 horas permitindo a detecção de menores concentrações do padrão (SHEPHARD, 1998; BENNETT et al. 1994).

Diferenças entre a metodologia oficial e outras metodologias empregadas podem ser visualizadas nas TABELAS 5.1, 5.2, 5.3, 6.1, 6.2, 6.3 e 6.4.

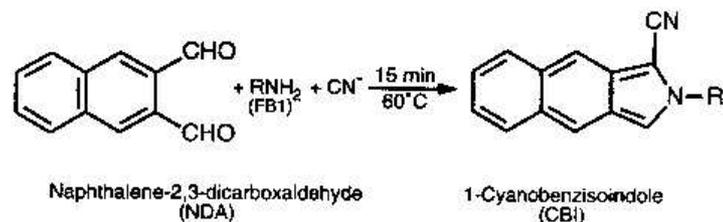


FIGURA 16 – REAÇÃO DA AMINA PRIMÁRIA DA FB1 COM DICARBOXIALDEIDO NAFTALENO (NDA) NA PRESENÇA DE ÍONS CIANETO (CN⁻) FORMANDO UM DERIVADO ESTÁVEL (BENNETT et al., 1994).

TABELA 5.1 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: EXTRAÇÃO, CLEAN UP, DERIVAÇÃO E CONDIÇÕES DE TRABALHO DO HPLC.

<i>Alimento</i>	<i>Referência</i>	<i>Fumonisina</i>	<i>Extração</i>	<i>Clean up</i>	<i>Derivação</i>	<i>HPLC</i>
Fubá e Creme de Milho	Bittencourt et al., 2004. - Brasil	B ₁ e B ₂	50 g da amostra 50 mL acetone-trila-água (1:1) agitação por 30 minutos e filtração	SAX (2 mL do filtrado)	OPA	Acetonitrila – água – ácido acético (50:50:1, v/v) Coluna: C ₁₈ (150 x 4.6 mm, partículas de 5 µm) Vazão de 1 mL / min Detector de fluorescência: 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão)
Milho e Cornflakes	Visconti et al., 2001 - AOAC Official Method 2001.04	B ₁ e B ₂ (mínimo de 0,4 e 0,1 µg.g ⁻¹)	20 g amostra 50 mL: acetone-trila+metanol+água (25+25+50 v/v/v) 20 min. agitação, filtração, centrifugação, filtração (dupla extração = 100 mL de filtrado)	Imunoafinidade (10 mL do filtrado)	OPA	Metanol e Fosfato ácido de sódio 0,1 M (77 + 23 v/v), pH 3,35 Coluna: C ₁₈ Vazão de 1 mL / min Detector de fluorescência: 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão) Curva de calibração: 0,025 – 2.000 µg.g ⁻¹ de B ₁ e 0,0125 – 1.000 µg.g ⁻¹ de B ₂ Tempo de retenção: 6 e 15 minutos
Produtos de milho (pipoca, chips)	Moller et al., 2000	B ₁ e B ₂ (mínimo de 1 e 2 µg.g ⁻¹)	12,5 g de amostra 150 mL de acetone-trila-água (1+1 v/v) agitação 200 ciclos / minuto por 30 minutos filtração em papel de filtro ajuste do pH do extrato para 6,2-6,5 para a SAX.	SAX + C ₁₈	OPA	Metanol 0,1 M e Fosfato ácido de sódio (68 + 32 v/v), pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico Vazão de 1 mL / min Detector de fluorescência: 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão)
				Imunoafinidade		
Milho	Martinez and Martinez, 2000 - <i>Venezuela</i>	B ₁	50 g amostra 100 mL metanol-água (3:1, v/v) 2 min, filtrado	SAX (10 mL do filtrado)	OPA	Água em coluna analítica C ₁₈ Vazão de 1,5 mL / min Detector de fluorescência: 338 nm (excitação) e 425 nm (emissão)

TABELA 5.2 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: EXTRAÇÃO, CLEAN UP, DERIVAÇÃO E CONDIÇÕES DE TRABALHO DO HPLC.

Alimento	Referência	Fumonisina	Extração	Clean up	Derivação	HPLC
Milho	Shephard et al., 2000 - <i>Iran (Método de Sydenham et al., 1996)</i>	B ₁ , B ₂ e B ₃ (0,01 µg.g ⁻¹)	20 g amostra 100 mL metanol + água (70+30) (conforme Sydenham et al., 1996)	SAX (conforme Sydenham et al., 1996)	OPA	Conforme Sydenham et al., 1996
Milho e Produtos de milho	Groves et al., 1999 - <i>China</i>	B ₁ B ₂ e B ₃ (0,5 µg.g ⁻¹)	5 g amostra 20 mL de acetonitrila-água (84+16, v/v) 60 min., filtragem, diluição em água	C ₁₈ (6 mL do filtrado em óxido de alumínio)	OPA	Etanol e água (1+1, v/v) com ácido acético 0,175 M
Tortilhas	Dombrink-Kurtzman and Dvorak, 1999 - <i>México</i>	B ₁	25 g da amostra 100 mL de acetonitrila-água (1:1) agitação por 60 minutos	C ₁₈ (2 mL do filtrado)	NDA	65% acetonitrila / ácido acético (99:1) e 35% água / ácido acético (99:1) Vazão de 0,7 mL / min Detector de fluorescência: 280 nm (excitação) e 470 nm (emissão)
Tortilhas	Stack, 1998 - <i>Washington</i>	B ₁	25 g amostra 100 mL acetonitrila + tampão fosfato ácido de sódio 0,1 M (pH = 3, ajustado com ácido fosfórico) Bater 4 min., filtragem, + 16 mL água, filtragem	C ₁₈ (5 mL filtrado)	OPA	Acetonitrila-água-ácido acético (50+50+1) Vazão de 1 mL / min Detector de fluorescência: 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão)
Milho	Sydenham, Shephard et al., 1996 - AOAC- IUPAC	B ₁ , B ₂ e B ₃ (500-8000 ng FB1/g, 200 a 3200 ng FB2, 100-1600ng FB3/g ou 800-12800 ng total/g)	50 g da amostra 100 mL metanol-água (3+1) (utilização de acetonitrila-água quando em combinação com C ₁₈) homogeneização por 5 minutos em liquidificador, centrifugação, filtragem em papel ajuste de pH para 5,8-6,5 com NaOH 1 M	SAX (10 mL do filtrado)	OPA	Metanol e Fosfato ácido de sódio 0,1 M (77 + 23 v/v), pH 3,3 ajustado com ácido ortofosfórico Coluna: C ₁₈ Vazão de 1 mL / min Detector de fluorescência: 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão)

TABELA 5.3 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: EXTRAÇÃO, CLEAN UP, DERIVAÇÃO E CONDIÇÕES DE TRABALHO DO HPLC.

<i>Alimento</i>	<i>Referência</i>	<i>Fumonisina</i>	<i>Extração</i>	<i>Clean up</i>	<i>Derivação</i>	<i>HPLC</i>
Genérico	Bennett et al., 1994	B ₁ e B ₂	25 g de amostra (peneiras de 2,36 mm de abertura) 100 mL de acetonitrila-água (50+50, v/v) ou de metanol em água 50, 60, 70 e 80% Agitação por 30 ou 60 minutos	C ₁₈ (produtos de hidrólise) SAX (fumonisinas isoladas)	NDA	Acetonitrila – água - ácido acético (60+40+10) Acetonitrila - ácido acético (99+1) e água – ácido acético (99+1) Detector de fluorescência: 420 nm (excitação) e 500 nm (emissão)
Milho	Sydenham et al., 1992a	B ₁ , B ₂ e B ₃	25 g da amostra 50 mL de metanol-água (3:1, v/v) 2 minutos em mixer centrifugação por 10 minutos	SAX (10 mL do centrígado filtrado)	OPA	Metanol 0,1 M e Fosfato ácido de sódio (80 + 20 v/v), pH 3,35 Vazão de 1 mL / min Çoluna C ₈ 12,5 cm x 4 mm Detector de fluorescência: 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão)
Milho	Shephard, et al., 1990	B ₁ e B ₂ (50 ng.g ⁻¹ e 100 ng.g ⁻¹)	25 g da amostra 50 mL de metanol-água (3:1, v/v) 5 minutos em mixer centrifugação por 10 minutos	SAX (5 mL do centrígado)	OPA	Metanol 0,1 M e Fosfato ácido de sódio (80 + 20 v/v), pH 3,3 Pré-coluna: C ₁₈ . Coluna: 25 cm x 4,6 mm Vazão de 1 mL / min Detector de fluorescência: 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão)

TABELA 6.1 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: CLEAN UP, DERIVAÇÃO E DILUIÇÃO DA AMOSTRA INJETADA NO HPLC.

<i>Alimento</i>	<i>Referência</i>	<i>Fumonisina</i>	<i>Clean up</i>	<i>Derivação</i>	<i>Diluição</i>
Fubá e Creme de Milho	Bittencourt et al., 2004 - Brasil	B ₁ e B ₂	SAX (2 mL do filtrado) Preparo coluna: 2 mL de metanol e 2 mL de água; amostra; 2 mL acetonitrila+água (2+8); eluição com 2 mL acetonitrila+água (7 + 3).	OPA Extrato seco diluído com 200 µL acetonitrila+ água (50 + 50 , v/v) e filtrado Reação: 100 µL + 200 µL OPA. Aplicar após 2 minutos	3,33 mg da amostra / µL injetado
Milho e Cornflakes	Visconti et al., 2001 - AOAC Official Method 2001.04	B ₁ e B ₂ (mínimo de 0,4 e 0,1 µg.g ⁻¹)	Imunoafinidade (10 mL do filtrado)	OPA Extrato seco diluído com 200 µL acetonitrila+ água (50 + 50 , v/v) Reação: 50 µL + 50 µL OPA. Agitar 30 s e aplicar após 3 minutos	10 mg da amostra / µL injetado
Produtos de milho(pipoca, chips)	Moller et al., 2000	B ₁ e B ₂ (mínimo de 1 e 2 µg.g ⁻¹)	SAX + C ₁₈ (20 mL do filtrado/ 2; centrifugar e secar até 4 mL: encher tubos com 15 mL de água , agitar e centrifugar por 10 minutos em alta velocidade; descartar precipitado) Preparo coluna SAX (fluxo de 1 a 2 gotas / segundo): 5 mL de metanol; 5 mL de água; amostra presente nos dois tubos incluindo lavagem com 2 mL de água cada; lavagem: 5 mL metanol; eluir com 15 mL metanol+ácido acético (99,5 + 0,5). Secar N ₂ a 65°C. Preparo d C ₁₈ : 5 mL de metanol; 5 mL de KCl 1%; amostra da SAX diluída em 5 mL de KCl 1% e 500µL metanol; lavagem: 5 mL KCl 1% (lavar tubo) e 5 mL de água; eluir com 5 mL acetonitrila+água (7 + 3). Secar N ₂ a 65°C. Imunoafinidade (20 mL do filtrado/ 2; centrifugar e secar até 4 mL: encher tubos com 15 mL de tampão , agitar e centrifugar por 10 minutos em alta velocidade; descartar precipitado)	OPA Extrato seco + 100 µL tetraborato de sódio 0,1M Reação: 100 µL + 200 µL de reagente OPA	5,5 mg da amostra / µL injetado

TABELA 6.2 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: CLEAN UP, DERIVAÇÃO E DILUIÇÃO DA AMOSTRA INJETADA NO HPLC.

Alimento	Referência	Fumonisina	Clean up	Derivação	Diluição
Milho	Martinez and Martinez, 2000 - <i>Venezuela</i>	B ₁	SAX (10 mL do filtrado) Preparo coluna: 2,5 mL de metanol+água (3+1); amostra; 25 mL metanol; eluição com 14 mL metanol+ácido acético (99 + 1).	OPA Extrato seco + 200 µL OPA	25 mg da amostra / µL injetado
Milho	Shephard et al., 2000 - <i>Iran (Método de Sydenham et al., 1996)</i>	B ₁ , B ₂ e B ₃ (0,01 µg.g ⁻¹)	SAX Conforme Sydenham et al.,1996	OPA Conforme Sydenham et al.,1996	
Milho e Produtos de milho	Groves et all, 1999 - <i>China</i>	B ₁ B ₂ e B ₃ (0,5 µg.g ⁻¹)	C ₁₈ (6 mL do filtrado)	Derivação com TMS: trimetilsilyl Extrato seco de 2 mL do eluído (55°C / 30 minutos) 0,5 g da amostra é derivada	
Milho e Produtos de milho	Shephard, 1998 - AOAC/IUPAC	B ₁ B ₂ e B ₃ (50 ng.g ⁻¹ ou menor)	C ₁₈ , SAX ou imunoafinidade	OPA ou NDA	
Produtos de milho (milho, polenta, snacks, pipoca, amido matinais, conserva de milho, milho congelado)	Silva et al., 1997 - <i>Uruguai</i>	B ₁ e B ₂ (50 ng.g ⁻¹)	SAX Preparo coluna: 2,0 mL metanol, 1,0 mL de metanol+água (3+1); amostra: 1 mL do filtrado; 0,5 mL de água, 0,5 mL de metanol; eluição com 1 mL metanol+ácido acético (99 + 1). Secagem do extrato em banho-maria a 60°C.	OPA Extrato seco diluído com 200 µL metanol Reação: 25 µL + 250 µL OPA.	0,05 mg da amostra / µL injetado

TABELA 6.3 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: CLEAN UP, DERIVAÇÃO E DILUIÇÃO DA AMOSTRA INJETADA NO HPLC.

<i>Alimento</i>	<i>Referência</i>	<i>Fumonisina</i>	<i>Clean up</i>	<i>Derivação</i>	<i>Diluição</i>
Milho	Sydenham, Shephard et al., 1996 -AOAC- IUPAC	B ₁ B ₂ e B ₃ (500-8000 ng FB1/g, 200 a 3200 ng FB2, 100-1600ng FB3/g ou 800-12800 ng total/g)	SAX Preparo coluna SAX: 5 mL de metanol; 5 mL de metanol-água (3+1); amostra: 10 mL (fluxo menor ou igual a 2 mL / minuto); lavagem: 5 mL metanol-água e 3 mL metanol; eluir com 10 mL metanol+ácido acético (99+ 1) (fluxo menor ou igual a 1 mL /minuto). Secar N ₂ a 60°C.	OPA Amostra diluída em 200 µL de metanol. Derivação: 25 µL da amostra + 225 µL reagente OPA Injetar 10 µL até 1 minuto após adição do reagente OPA. Solução padrão: 50 µg / mL (validade de 6 meses a 4°C)	2,5 mg da amostra / µL injetado
Genérico	Bennett et al., 1994	B ₁ e B ₂	C ₁₈ Preparo coluna C ₁₈ : (fluxo de 2 mL / minuto): 5 mL de metanol; 8 mL de metanol-água; amostra: 2 mL extrato + 4 mL metanol-água (secar coluna por 15 minutos) ; lavagem: 5 mL acetona:acetato de etila; eluir com 10 mL metanol+clorofórmio+ácido acético (60+ 40 + 10). Teste recuperação: 10 µg de FB1 e de FB2 em 10 mL de metanol-água SAX (fumonisinas isoladas) Preparo da SAX: (fluxo de 1 mL / minuto): 5mL de metanol; 5 mL de metanol-água; amostra: 2 mL extrato + 8 mL de metanol-água; lavagem: 8 mL metanol-água e 3 mL de metanol; eluir com 10 mL metanol-ácido acético (99 + 1). Teste recuperação: 10 µg de FB1 e de FB2 em 6 mL de metanol-água	NDA Extrato seco em 1 mL de MeOH 1000 µL tampão borato de sódio pH 9,5 + 500 µL NDA (2 mg / 8 mL de metanol grau U.V.)+ 500 µL NaCN (13 mg / 100 mL) (mistura; 60°C/ 15 minutos) 7 mL de tampão fosfato pH 7,0 e acetonitrila (40:60)	0,125 mg da amostra / µL injetado

TABELA 6.4 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS. ETAPAS COMPARADAS: CLEAN UP, DERIVAÇÃO E DILUIÇÃO DA AMOSTRA INJETADA NO HPLC.

<i>Alimento</i>	<i>Referência</i>	<i>Fumonisina</i>	<i>Clean up</i>	<i>Derivação</i>	<i>Diluição</i>
Milho	Sydenham et al., 1992a	B ₁ , B ₂ e B ₃	SAX Preparo coluna SAX: 5 mL de metanol; 5 mL de metanol:água (3+1); amostra: 10 mL; lavagem: 8 mL metanol:água (3+1); e 3 mL de metanol; eluir com 10 mL metanol+ácido acético (99 + 1). Secar N ₂ a 60°C	OPA Extrato seco (4 mL) diluído com 200 µL de metanol Reação: 25 ou 50 µL + 225 ou 200 µL OPA.	1 a 2 mg da amostra / µL injetado
Milho	Shephard, et al., 1990	B ₁ e B ₂ (50 ng.g ⁻¹ e 100 ng.g ⁻¹)	SAX Preparo coluna SAX: 8 mL de metanol; 8 mL de metanol:água; amostra: 5 mL; lavagem: 8 mL metanol:água e 3 mL de metanol; eluir com 14 mL metanol+ácido acético (99,5 + 0,5). Secar N ₂ a 60°C	OPA Extrato seco diluído com 200 µL de borato de sódio 0,1 M Reação: 50 µL + 200 µL OPA.	2,5 mg da amostra / µL injetado

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAL DE CONSUMO

- HPLC com detector de fluorescência (marca SHIMADZU)
- Módulo de aquecimento com acessório de secagem com gás (marca MARCONI)
- Agitador de amostras com capacidade para doze unidades de frascos em suspensão (marca PACHANE)
- Liquidificadores
- Processadores de alimentos
- Pré-coluna C₁₈
- Colunas C₁₈: marca STR 150L x 4.6mm, partículas de 5µm e porosidade de 120Å; SUPELCO 25 cm x 4,6 mm, partículas de 5µm; HICHROM 15 cm x 4,6 mm, partículas de 5µm e porosidade de 150Å.
- Colunas SPE: SAX das marcas MERCK, VARIAN e APPLIED SEPARATIONS e C₁₈.da MERCK com capacidades de 3 mL e 500 mg de sorbente.

Padrões:

- **Solução-mãe de padrão FB₁** (marcas CALBIOCHEM e SIGMA) **ou FB₂**, (marca SIGMA): 1µg/µL. Dissolver 1 mg do padrão em 1000 µL de acetonitrila - água (1+1). Estoque em temperatura de -4°C.
- **Padrão FB₁**: 0,1 µg/µL. Elaborado a partir de 20 µL de padrão 1µg/µL(solução mãe) e 1980 µL de acetonitrila - água (1+1). Estoque em temperatura de -4°C.
- **Padrão FB₁**: 0,01 µg/µL. Elaborado a partir de 10 µL de padrão 0,1µg/µL e 990 µL de acetonitrila - água (1+1). Estoque em temperatura de -4°C.
- **Padrão FB₁+FB₂**: 0,05 µg/µL. Elaborado a partir de 200 µL de cada padrão 1µg/µL(solução mãe) e 3600 µL de acetonitrila - água (1+1). Estoque em temperatura de -4°C.

Reagentes e soluções:

- **Tampão (pH 9,5):** 10,16 g de tetraborato de potássio (PM 201,22; 99% pureza) em 1000 mL de água milliQ. Obs: sal de difícil solubilidade.
- **Cianeto de potássio:** 13 mg de cianeto de potássio em 100 mL de água milliQ.
- **Solução NDA:** 2 mg em 4 mL de metanol. Estoque em freezer a -4°C .
- **Reagente OPA:** 40 mg de OPA em 1 mL de metanol; diluir com 5 mL de tampão tetraborato de sódio (pH 9,5); adicionar 50 μL de 2-mercaptoetanol. Este reagente deve ser estocado no escuro por período máximo de uma semana.
- Acetonitrila Grau HPLC
- Metanol P.A.
- Ácido acético P.A.
- Água MilliQ
- Solução NaOH 0,05 M
- Solução CH_3COOH 0,5 M

3.2 PRODUTOS ANALISADOS

Foram analisadas um total de 207 amostras, sendo 62 de fubá, 23 de milho para pipoca, 21 de farinha de milho, 21 de flocos de milho, 20 de cornflakes, 20 de snacks de milho, 11 de creme de milho, 15 de milho verde enlatado cozido em salmoura ou milho verde enlatado cozido a vapor, 8 de milho verde congelado ou supercongelado e 6 de milho verde in natura. As amostras foram coletadas pelo Departamento de Vigilância Sanitária do Distrito Federal (DIVISA – DF) como amostras controle, dentro do Programa de Vigilância Sanitária do Laboratório de Micotoxinas do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) ou adquiridas em estabelecimentos da região no período de março de 2003 a janeiro de 2005.

As amostras foram coletadas em quantidades que variavam de um quilograma a um quilograma e meio, de acordo com a gramatura de cada embalagem do produto.

Raras exceções foram as de embalagens unitárias com aproximadamente dois quilos de milho enlatado em salmoura e milho verde em espiga com palha. A quantidade de amostra a ser coletada recomendada pelo JECFA é de 1 kg para creme de milho e fubá, cornflakes, milho de pipoca e chips; 5 kg para milho e 7,5 kg para milho em espiga, para milho integral e milho em espiga (considerando que o sabugo contribui para 30% do peso total e cada espiga possui aproximadamente 100 g de grãos). Para o milho verde in natura trabalhou-se com amostras de um quilograma e para milho sem espiga e um quilo e meio para milho em espiga.

3.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS FB₁ E FB₂ EM PRODUTOS DE MILHO

A análise quantitativa de fumonisinas em alimentos segue as etapas de amostragem, redução de amostra, pesagem, extração por solvente, separação do sobrenadante, clean up do extrato, derivação, aplicação no HPLC com detector de fluorescência e análise dos resultados.

Para implantação e validação do método de análise para fumonisinas FB₁ e FB₂ foram necessárias avaliações de recuperação do padrão nas diversas etapas da análise. Para realização de um trabalho coerente seguiu-se a ordem abaixo:

- 1º). Conhecimento operacional do HPLC e detector de fluorescência;
- 2º). Estabelecimento das condições operacionais do HPLC e do detector de fluorescência para análise de fumonisinas: definição dos solventes e seus gradientes, fluxo e comprimentos de onda de excitação e de emissão;
- 3º). Preparo, estoque e avaliação de soluções padrões de fumonisinas;
- 4º). Familiarização com os processos de derivação das fumonisinas com NDA e com OPA;
- 5º). Refinamento das condições de trabalho do HPLC e detector de fluorescência
- 6º). Familiarização com os possíveis processos de extração;
- 7º). Familiarização com os processos de clean up empregando SPE SAX ou SPE C₁₈;

- 8º). Definição do tipo de coluna SPE a ser empregada no processo de clean up e concomitantemente a definição do composto a ser empregado para derivação (NDA ou OPA);
- 9º). Definição do processo de clean up a partir de testes de recuperação;
- 10º). Validação do método.

Em função da baixa recuperação obtida nos testes para validação da metodologia, identificou-se a fase de extração como etapa crítica. Foram realizados testes para garantir a recuperação na fase de extração, para posterior validação. No decorrer do trabalho as outras etapas de análise foram passando por refinamentos. Considera-se aceitável num processo de validação de metodologia, uma recuperação na faixa de 70-110% e coeficiente de variação entre amostras repletas <20% (CASS & DEGANI, 2001).

3.3.1 Preparo das amostras

Os produtos de milho analisados podem ser classificados em dois grupos: produtos secos - fubá, creme de milho, farinha de milho, flocos de milho, cornflakes e snacks de milho, e úmidos - milho verde in natura, enlatado, congelado ou supercongelado. Enquanto os produtos secos são caracterizados por uma umidade próxima a 9%, variando de 5% a 14%, os produtos úmidos apresentavam-na numa faixa de 66% a 86%, de acordo com a informação nutricional de rotulagem (ANVISA, 2003) e tabelas brasileiras de composição de alimentos (NEPA/UNICAMP, 2004; USP, 1998).

Assim que recebidas, as amostras foram registradas e identificadas pelo número de coleta, no caso daquelas fornecidas pelo DIVISA - DF, ou pelo código de chegada criado para o projeto quando estas eram adquiridas. Cada registro consta das informações nome do produto, marca, fabricante, endereço do fabricante, data de fabricação e vencimento ou data de validade, número do lote, peso de cada unidade e número de unidades ou peso quando a granel. As amostras foram conservadas de acordo com as recomendações de cada produto e fabricante até o momento da análise.

No Laboratório, as amostras foram reduzidas de amostra laboratorial para amostra de análise empregando-se técnica de quarteamento. As amostras de farinha de milho, flocos de milho, cornflakes e snacks de milho foram trituradas em multiprocessador de alimentos até obtenção de pó fino, com granulometria igual ou entre as dos produtos creme de milho e fubá. As amostras de milho de pipoca foram trituradas em multiprocessador até a obtenção de partículas com diâmetro máximo inferior a 0,84 mm utilizando peneira ABNT/MESH: 20. Segundo Sydenham et al. (1996_a) a amostra de milho integral deve ser misturada e triturada até que 90% do material fique retido entre 500 e 250 μm . Procurou-se obter diâmetro aproximado ao da recomendação triturando o milho de pipoca de maneira que todo material passasse facilmente pela peneira de 20 mesh (100% das partículas menores que 840 μm). Frações das amostras secas foram transferidas, após quarteamento, trituração e homogeneização, para frascos de vidro vedados conservados em local seco e à temperatura ambiente. As amostras de creme de milho e fubá não receberam nenhum tratamento prévio antes da análise. As frações de amostras secas não trituradas foram mantidas na embalagem original devidamente fechada e as amostras úmidas congeladas.

As amostras úmidas foram trituradas em multiprocessador de alimentos até obtenção de material homogêneo. No caso das amostras de milho verde enlatado cozido em salmoura, os grãos foram escorridos e triturados e a salmoura reservada para análise em separado. Os volumes de salmoura recolhidos foram inicialmente mensurados para controle de peso líquido drenado, encontrando-se os produtos em conformidade com a respectiva informação declarada em rótulo. As salmouras foram conservadas sob temperatura de congelamento e avaliadas posteriormente se detectada a presença de fumonisinas no grão de milho correspondente.

3.3.2 Extração

Segundo vários autores (BENNETT et al.; 1994; GIROLAMO et al., 2001; SHEPHARD, 1998a) a solução acetone-trila-água (50:50) é a mais eficiente para extração de micotoxinas, e a mesma foi utilizada no início do trabalho. Um volume 100 mL de solvente de extração para cada 50 gramas, 25 g de amostra ou 12,5 g (snacks)

de amostra foi utilizado. Esta quantidade menor de amostra utilizada com snacks, resultando em uma maior relação solvente/amostra, foi necessária devido à natureza extrusada deste produto, que atribui característica física expandida e modificação do amido, que passa a ter maior resistência a molhabilidade.

Além do tipo de solvente, e relação massa/volume de solvente, avaliou-se no processo de extração o mecanismo a ser utilizado – processador de amostras, agitador ou centrifugação. A utilização de agitador ou centrifugação possibilita o processamento de seis amostras em duplicata ao mesmo tempo, o que diminui o tempo de análise/amostra. A utilização de processadores demandaria um investimento em número de processadores e disponibilidade de material limpo e descontaminado. Alguns autores (SYDENHAM et al., 1992) afirmam obter o mesmo resultado de extração ao se bater a amostra com solvente em processador por 5 minutos quando comparada a agitação de 25 g da amostra com 100 mL Acetonitrila - Água (1:1) por 60 minutos. Girolamo et al., (2001) mostram que dependendo do tipo de matriz existe diferença na recuperação das fumonisinas B₁ e B₂ entre os dois tipos de extração, como no caso de muffins e fórmulas infantis.

Após a extração, o produto foi filtrado em papel de filtro comum. O volume do filtrado foi verificado para todas as amostras notando-se um volume final aproximado para os mesmos tipos de amostra.

Produtos secos

Os testes de recuperação da fase de extração foram iniciados com amostras secas que já haviam passado pela recuperação na fase de clean up.

Durante o processo de implantação e validação desta fase alguns testes foram realizados sem sucesso até ser descoberta a deficiência no procedimento adotado:

- Extração por agitação e filtragem variando-se períodos de agitação;
- Extração diminuindo a proporção de amostra com relação ao volume de solvente;
- Modificando-se o tipo de processo de extração por agitação/centrifugação e mistura com solvente em processador por 5 minutos.

Os resultados variavam de 23,6% a 98,1% para FB₁ (mediana de 53%) e de 4,6% a 195,5% para FB₂. (mediana de 54%);

A estabilidade das fumonisinas em metanol-água (JECFA, 2001) foi testada nas condições de extração adicionando-se padrão ao solvente e levando-o a agitação. Alíquotas foram recolhidas nos tempos 0, 10, 20, 30 e 60 minutos, derivadas e aplicadas no HPLC. Não foi constatada evaporação do solvente durante a agitação. A recuperação para FB₁ foi de 99,6% e para FB₂ de 111,3%.

A baixa recuperação evidenciada nos testes e a grande variação na recuperação das fumonisinas dentro de uma mesma rotina de extração por agitação poderiam estar ocorrendo devido a variações de pH do solvente.

Analisando os resultados dos testes de recuperação da fase de extração com amostras de pipoca e solvente ficou claro que a questão de tempo de agitação não influenciava os resultados e que não havia perda das fumonisinas em metanol. Como a variação de resultados de recuperação era grande buscou-se avaliar que outros fatores poderiam afetar a extração das fumonisinas da amostra.

A extração se baseia principalmente na característica de polaridade do analito. Outros fatores poderiam estar afetando esta interação das fumonisinas com a amostra. Sendo o alimento uma matriz complexa, esta interação, característica da constituição química do alimento pode ser influenciada por fatores como pH. De acordo com Scott & Lawrence (1994) os resultados de recuperação em diferentes produtos de milho eram influenciados pelo pH do solvente. Nos resultados de recuperação estudados pelos autores a recuperação a partir de extração realizada com metanol-água acidificada era sempre inferior do que quando se utilizava metanol-água ou metanol-tampão borato (pH 9.2).

Quando o pH do solvente de extração passou a ser monitorado, observou-se variação de pH de acordo com a marca de metanol e aplicação de água destilada ou milliQ. Considerando o pH da água como neutro, o fato do metanol ser utilizado em maior proporção no solvente de extração, que o pH de produtos de milho está na faixa de 6,0, e que para melhor recuperação no clean up o extrato deve se apresentar com pH na faixa de 5,8 a 6,5 (SYDENHAM et al., 1996a), o pH do solvente de extração

passou a ser corrigido para 6,0 antes da extração. A partir desta modificação foi possível realizar a recuperação do padrão em milho de pipoca.

De acordo com a marca de metanol foi utilizada solução hidróxido de sódio 0,05 M ou ácido acético 0,5 M para correção do pH. Para amostras de pipoca e similares como fubá, farinha de milho, flocos de milho, creme de milho e snacks o solvente de extração foi definido como metanol-água (3+1) com pH 6,0.

Em teste de extração para cornflakes utilizando metanol-água (3+1) pH 6,0 a recuperação foi de 105%, 82% e 65% para concentrações de 64 µg/kg, 480 µg/kg e 800 µg/kg para FB₁. Já para FB₂ as recuperações foram decrescentes com o aumento da concentração de enriquecimento, respectivamente de 108%, 33% e 28%.

Em estudo realizado nos Países Nórdicos (PETERSEN & THORUP, 2001) verificou-se a recuperação em duas amostras de cornflakes numa concentração de 200 µg / kg de FB₁ e FB₂ com resultados de 81 e 104% para B₁ e 80 e 104% para B₂. Girolamo et al. (2001) realizaram comparações entre diferentes procedimentos de extração e clean up para cornflakes. Para amostras naturalmente contaminadas ou enriquecidas com 1.500 µg / kg de FB₁+FB₂ a melhor recuperação para cornflakes foi obtida com a utilização de coluna de imunoafinidade ao invés de SAX; extração com ACN ao invés de MeOH; maior quantidade de amostra e maior relação de solvente para a amostra. Em outro estudo que evidencia a estabilidade e problemas de recuperação de fumonisinas em produtos de milho (SCOTT & LAWRENCE, 1994) foi realizada recuperação nas amostras de cereal de milho com fibras adicionadas de fumonisinas com extração empregando metanol-água (3+1) e derivação com NDA, obtendo os seguintes resultados: 34% para FB₁ e 0% para FB₂ quando a amostra foi adicionada de 2.500 µg / kg de FB₁ e FB₂; e 73% para FB₁ e 66% para FB₂ quando a amostra foi adicionada de 1.000 µg / kg de FB₁ e FB₂. No mesmo estudo, resultado eficiente foi obtido em método que empregava extração realizada com MeOH:tampão borato 0,4M e derivação com 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazol obtendo 115% para FB₁ e 96% para FB₂ (amostra adicionada de 2.500 µg / kg de FB₁ e FB₂). Ao mudar apenas o solvente para metanol-água (3+1) foi obtido 83% para FB₁ e 79% para FB₂ (amostra também adicionada de 2.500 µg / kg de FB₁ e FB₂).

Como o cornflakes é um produto comumente enriquecido com ferro, deve-se verificar a possibilidade de interferência desta substância na recuperação das amostras. Das substâncias ferrosas adicionadas no intuito de enriquecer o produto, apenas o sulfato ferroso hepta-hidratado apresenta-se como grande interferente na recuperação de fumonisinas (SCOTT & LAWRENCE, 1994). Diminuição na recuperação passa a ser observada no estudo a partir de 10 mg.g^{-1} de sulfato ferroso hepta-hidratado e recuperação nula foi encontrada com 200 mg.g^{-1} (SCOTT & LAWRENCE, 1994).

As amostras de cornflakes avaliadas no presente trabalho continham um mínimo de $0,7 \text{ mg.g}^{-1}$ de sulfato ferroso e $1,29 \text{ mg.g}^{-1}$ de sulfato ferroso hepta-hidratado. Segundo Scott & Lawrence (1994) num enriquecimento de cereais de milho com fibras com $1.000 \mu\text{g} / \text{kg}$ de FB_1 e FB_2 e extração com metanol-água, na presença de: $0,33 \text{ mg.g}^{-1}$ de sulfato ferroso a recuperação de FB_1 foi de 68% e de FB_2 de 54%; $0,7$ de sulfato ferroso de 67% e 84% respectivamente; $1,2$ de sulfato ferroso hepta-hidratado recuperação de 78% de FB_1 , $1,8$ de sulfato ferroso hepta-hidratado recuperação de 63% de FB_1 ; $5,0$ de sulfato hepta-hidratado: recuperação de 82% de FB_1 e 64% de FB_2 .

A partir destas informações a melhor medida a ser tomada seria a substituição do solvente de extração (metanol-água (3+1) pH 6,0) por metanol-borato de sódio (pH 9,2) (3+1) para a extração de cornflakes. A aplicação deste último melhorou o desempenho do método na recuperação de fumonisinas, principalmente da FB_2 .

Produtos úmidos

Foram realizados testes de recuperação para a metodologia completa com amostra de milho verde. Nesta etapa do estudo a fase de clean up já havia sido validada para amostras secas (fubá e milho para pipoca) e empregava-se o método de Sydenham et al. (1996a), modificado na fase de eluição das fumonisinas da coluna, secagem do eluído, e produto empregado para derivação. Na extração modificou-se o método original na proporção de amostra/solvente, empregando-se menor massa com relação ao solvente ($25\text{g}/100\text{mL}$ de metanol-água (3+1)) e utilizando-se agitação por 30 minutos ao invés de bater a amostra com o solvente em processador por 5 minutos.

A recuperação, independente da concentração de enriquecimento avaliada era inferior a 12%. Como a recuperação na fase de clean up já havia sido validada para fubá e milho de pipoca, o processo de derivação e análise em HPLC já definidos, provavelmente o problema de recuperação encontrava-se na fase de extração. Como as amostras utilizadas para validação da fase de clean up eram amostras secas e o milho verde uma amostra úmida a questão da polaridade do solvente de extração deveria ser avaliada.

Com relação à recuperação das amostras úmidas na fase de extração, levou-se em consideração que a umidade chega a ser de até 4x mais que a encontrada em amostras secas. A polaridade do solvente de extração deveria ser alterada com aumento da fração de metanol. Desta forma, ao final do processo de extração, a polaridade do sobrenadante estaria mais próxima da polaridade das fumonisinas. Utilizando metanol-água (85+15) pH 6,0, (4+1) pH 6,0 e (4+1) pH 5,5 a recuperação variou numa faixa de 16 a 30%. Excluída a possibilidade de pH e polaridade do solvente, outro fator estaria prejudicando a recuperação. Trucksess et al. (1995) obteve recuperação eficiente de FB₁ em milho enlatado e milho congelado utilizando metanol-água (4+1) e a adição de 10% de cloreto de sódio sobre o peso da amostra. O sal neutro em concentrações de 10% no alimento leva a desnaturação de proteínas e quebra de emulsão (ARAÚJO, 1995).

A recuperação em milho em conserva empregando solução metanol-água (4+1) e adicionando 10% p/p de cloreto de sódio a amostra foi eficiente para FB₁, mas não para FB₂. Como normalmente as concentrações de FB₂ são bem inferiores às de FB₁, decidiu-se priorizar a última em detrimento da primeira. Para as amostras úmidas (milho verde, milho enlatado e milho congelado) ficou definido este procedimento para extração avaliando-se apenas a contaminação por FB₁.

A salmoura do milho em conserva representa fração do peso líquido indicado na embalagem do produto. Logo, se analisada à parte do milho escorrido, o peso seria a melhor medida para obtenção de dados compatíveis com a estimativa de ingestão diária de fumonisinas. O emprego direto da salmoura misturada a metanol na fase de clean up dificultou o fluxo de passagem da amostra, dos solventes de lavagem e dos solventes de eluição. Para análise da salmoura eram então pesadas 25 gramas deste

material que recebia o mesmo tratamento de extração utilizado para amostras úmidas. Quando o milho em conserva escorrido se apresentava contaminado a salmoura correspondente apresentava contaminação similar e quando o milho em conserva não apresentava contaminação também não era detectada contaminação na salmoura. Desta forma, passou-se a analisar a salmoura somente quando a contaminação do milho em conserva era positiva.

3.3.3 Clean up

Os métodos de análise para fumonisina têm empregado para clean up SPE Strong Anion Exchange – SAX, SPE Octadecil – C18, ou colunas de imunoafinidade. As colunas de imunoafinidade começaram a se tornar populares nos últimos anos sendo utilizadas na análise de fumonisinas em estudos mais recentes (VISCONTI et al, 2001; TRUCKSESS et al, 1995). Apesar de bastante seletiva, seu custo é de 3 a 4 vezes superior ao das colunas tradicionais e sua utilização não foi testada neste trabalho.

As colunas SAX apresentam melhor relação custo-benefício, pois são mais seletivas que as C₁₈. As SPE SAX apresentam aminas quaternárias como grupos funcionais ligadas à sílica que interagem fortemente com as funções ácidas das fumonisinas. Desta forma, propiciam um extrato pós clean up com menor número de interferentes.

Para avaliação da melhor coluna a ser utilizada comparou-se a qualidade do clean up entre SAX e C₁₈ a partir da aplicação de extratos obtidos por agitação com acetonitrila-água de cada tipo de produto de milho e derivações com NDA e OPA. Foi mostrado a partir destes primeiros testes, que para a maioria dos produtos de milho, o clean up com a SAX era suficiente para obtenção de cromatogramas sem interferentes na região de tempo de retenção da FB₁, quando utilizada extração com acetonitrila-água e derivação com NDA. Limitações quanto à previsão da qualidade de futuros cromatogramas se encontravam: na mudança do solvente de extração para metanol-água, que carrega maiores interferentes; o desconhecimento, inicialmente, do tempo de retenção da FB₂; e o fato de ainda não ter sido realizada na época testes de recuperação para as etapas de clean up e extração. O último ponto induz a lógica de

que assim como poderia não se ter uma boa recuperação de fumonisinas nestas condições, poderia não se ter uma maior presença de interferentes.

Nesta mesma seqüência de testes, a amostra de milho congelado empregada foi a única a apresentar interferente na área de pico da fumonisina FB₁ problema que poderia ser solucionado pelo clean up combinado de SAX e C18. Adotou-se então este procedimento nos testes seguintes para a amostra de milho verde congelado. Em testes de extração com acetonitrila-água e derivação com OPA, concluiu-se que todas os produtos de milho a serem avaliados deveriam passar por clean up SAX + C18, já que a massa de amostra injetada era bem maior do que na derivação com NDA. A maior quantidade de amostra injetada levava a aparição de grandes interferências nos cromatogramas com relação ao tempo de retenção da FB₁. Tal fato foi considerado como ponto negativo no emprego da derivação com OPA. A concentração da amostra não seria confortavelmente diminuída, já que a fluorescência do composto formado na derivação é menos intensa quando comparada à fluorescência do composto formado com NDA.

O clean up das amostras foi realizado como descrito a seguir:

Procedimento para Coluna SPE SAX: Condicionamento da coluna: 5 mL de metanol; 5 mL de metanol:água (3+1). Amostra: 5 mL do extrato; Lavagem: 8 mL de metanol:água (3+1); 3 mL de metanol. Para eluir: 12 mL de metanol:ácido acético (99+1). Secagem em módulo de aquecimento a 60°C e gás nitrogênio. Foi necessária a utilização de vácuo por bomba para tratamento das amostras de milho cru e milho congelado no intuito de estabelecer fluxo menor ou igual a 1mL/segundo. Nas demais amostras o vácuo para tal fluxo foi estabelecido por fluxo de água. Durante eluição desligava-se o vácuo para que o fluxo se mantivesse a 1 mL /segundo.

Procedimento para Colunas SPE SAX e C₁₈: Para SAX utilizou-se procedimento acima descrito. Para C₁₈: Extrato seco obtido da SAX foi diluído em 0,5 mL de metanol e 5 mL de solução de cloreto de potássio a 1%. Condicionamento da coluna: 5 mL de metanol; 5 mL de água:cloreto de potássio (99+1). Amostra: Extrato seco obtido da coluna SAX diluído em 0,5 mL de metanol e 5 mL de solução de cloreto de potássio a 1%. Lavagem: 5 mL de água:cloreto de potássio (99+1). Lavagem do frasco da amostra antes de passagem do solvente na coluna; 5 mL de água. Para eluir: 5 mL de

acetonitrila:água (7+3). Secagem em módulo de aquecimento a 60°C e gás nitrogênio. O clean up SAX + C₁₈.

Segundo MOLLER et al (2000), a combinação das colunas SAX e C18 para clean up das amostras resultam em recuperação e repetibilidade comparáveis à utilização da coluna de imunoafinidade. Efeitos positivos dos testes realizados com o clean up combinado podem ser observados na comparação das FIGURAS 17 e 18. A adição de fumonisina B₁ às amostras a serem enriquecidas foi realizada antes da derivação do material seco resultante do clean up. Nos cromatogramas da amostra de milho congelado de tratamento SAX + C₁₈ nota-se a presença de um interferente ao final da corrida que foi identificado como oriundo da coluna C₁₈, já que não estava presente no cromatograma correspondente ao clean up realizado em SAX do mesmo extrato de amostra. O procedimento de condicionamento da C₁₈ foi modificado para evitar possíveis interferências de análise.

Para evitar a presença de interferentes oriundos do material da coluna SPE resolveu-se adequar o condicionamento das últimas com solventes utilizados na eluição das fumonisinas. Foram realizadas então as seguintes modificações (Teste 1 da TABELA 8.1):

- Modificações do condicionamento da SAX: 1º) 3 mL de metanol - ácido - acético (99+1); 9 repetições de 3 mL de acetonitrila-água (1+1), 2º) 3 repetições de 3 mL de acetonitrila-água (1+1).
- Modificação do condicionamento da C₁₈: 1º) 3 mL de acetonitrila:água (7+3); 3 repetições de 3mL de solução de cloreto de potássio a 1% + 0,3 mL de metanol.

A modificação do condicionamento da C₁₈ resultou na eliminação do interferente. No caso da SAX, a dificuldade de trazer a coluna às condições de pH anteriores a aplicação do ácido acético descartou a hipótese de modificação na fase de condicionamento. Além da literatura não fazer menção ao emprego de ácido acético para melhor condicionamento da coluna, deve-se considerar que as recuperações para SAX são superiores as encontradas para C₁₈, e que os métodos que empregam a SAX apresentam boas recuperações na validação.

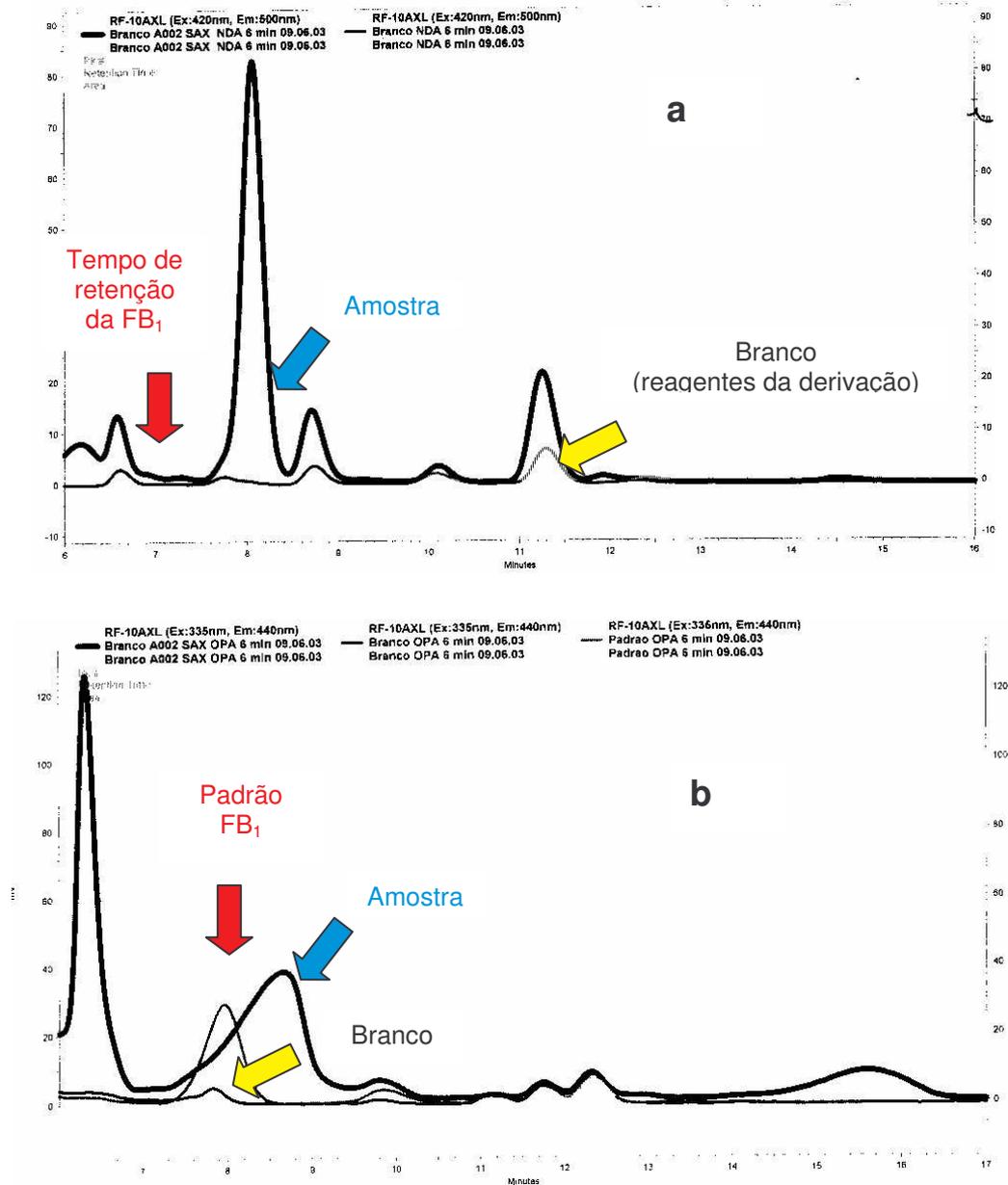


FIGURA 17 – AMOSTRA DE MILHO CONGELADO NÃO ENRIQUECIDA UTILIZANDO SAX PARA CLEAN UP E DERIVAÇÃO COM NDA (a) e OPA (b). SÃO REPRESENTADOS EM LINHAS MAIS ESTREITAS CROMATOGRAMAS DOS REAGENTES (BRANCO) E DO PADRÃO FB_1 PURO RESPECTIVAMENTE. TEMPO DE RETENÇÃO DO PADRÃO FB_1 : 7,9 MINUTOS.

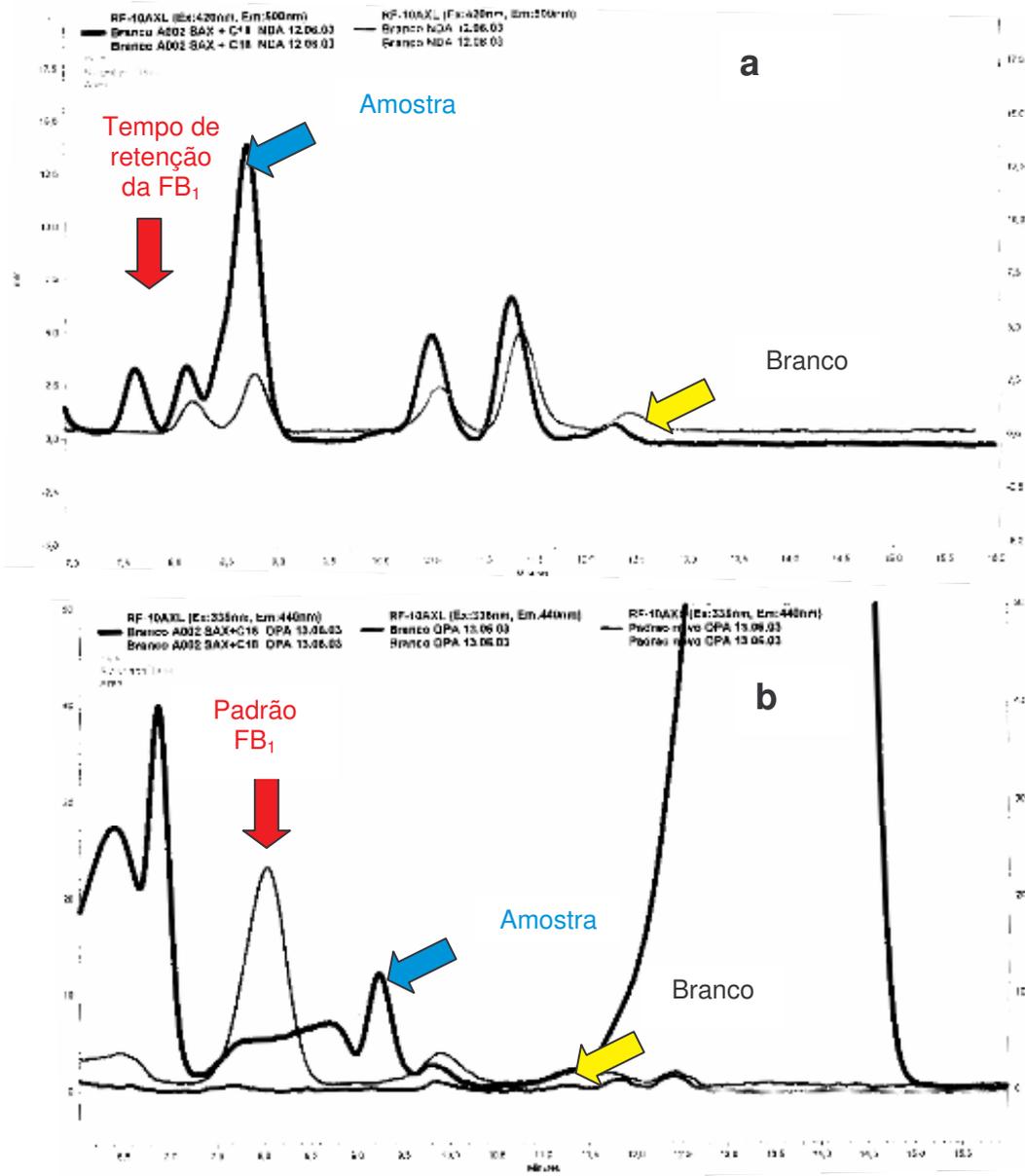


FIGURA 18 – AMOSTRA DE MILHO CONGELADO NÃO ENRIQUECIDA UTILIZANDO SAX + C18 PARA CLEAN UP E DERIVAÇÃO COM NDA (a) OPA (b). SÃO REPRESENTADOS EM LINHAS MAIS ESTREITAS CROMATOGRAMAS DOS REAGENTES (BRANCO) E DO PADRÃO RESPECTIVAMENTE. TEMPO DE RETENÇÃO DO PADRÃO FB₁: 7,9 MINUTOS.

A escolha da SAX para clean up no trabalho experimental fundamentou-se em seus melhores resultados de recuperação relatados na literatura quando a mesma era comparada à C₁₈ e à menor presença de interferentes nos cromatogramas (SHEPHARD, 1998). Além disso, a possibilidade de utilização de metanol-água como solvente de extração ao invés de acetonitrila-água que resulta em uma maior

concentração de interferentes no extrato (SYDENHAM et al. 1996_a). Os resultados dos primeiros experimentos de clean up indicam que a combinação SAX+C₁₈ poderia ser uma alternativa para amostras que apresentem problemas de interferência.

Definidas as especificações das colunas a serem utilizadas no clean up, iniciou-se o trabalho de recuperação do padrão desta etapa.

Foram realizados alguns testes modificando-se o método oficial da Association of Analytical Communities (AOAC) para quantificação de fumonisinas (SYDENHAM et al., 1996_a) até ser descoberta a deficiência no procedimento adotado para a fase de clean up:

- Utilizando acetonitrila-água como solvente (TABELAS 7.1 e 7.2). O método utilizado para C₁₈ foi baseado no método combinado SAX + C₁₈ de Möller et al.(2000);
- Redução da temperatura de secagem do extrato das colunas SPE de 60°C para 40°C foi realizada pela suspeita de alteração química das fumonisinas na presença de metanol (TABELA 8);
- Comparando-se eficiência de repetibilidade de diferentes marcas de coluna SPE SAX (TABELA 9).

A redução da temperatura de secagem do extrato das colunas SPE de 60°C para 40°C foi realizada pela suspeita de alteração química das fumonisinas na presença de metanol. O padrão em alíquota da solução de trabalho (0,05 µg/ µL em acetonitrila-água (1:1)) adicionado de metanol-ácido acético e seco sob nitrogênio em a 60°C apresentou uma redução na concentração de FB₁ de 45,2% e na de FB₂ de 46,4%. Quanto maior o volume de extrato em metanol-ácido acético seco sob nitrogênio maior a perda observada. A redução da temperatura de secagem para 40°C resultou em uma redução inferior a 22 % da concentração inicial do padrão. Assim, como medida de acompanhamento, o padrão controle aplicado no HPLC passou a ser adicionado de metanol-ácido acético e seco a temperatura de 40°C antes da derivação para acompanhamento dos estudos de recuperação.

Com a impossibilidade de adequar a fase de clean up para extrato em acetonitrila-água nos diversos testes realizados, adotou-se o procedimento de clean up do método oficial da AOAC (SYDENHAM et al., 1996_a) modificando-se o volume de

eluído e a temperatura de secagem do extrato limpo. Cada 10 mL do extrato da amostra aplicados receberam 20 μ L de padrão misto de FB₁ e FB₂ (0,05 μ g/ μ L de cada). A extração foi feita com metanol:água (3+1) ao invés de acetonitrila-água (1+1) e foi realizado ajuste de pH do extrato da amostra para a faixa de 5,8 a 6,5 quando necessário com solução de NaOH 0,05M:

- Extração da amostra: 50 gramas de amostra em agitação por 30 minutos com 100 mL de metanol:água (3+1). Filtragem em papel de filtro;
- Ajuste de pH do extrato para a faixa de 5,8 a 6,5 com hidróxido de sódio 0,05M;
- Procedimento de clean up: Condicionamento da coluna: 5 mL de metanol; 5 mL de metanol:água (1+1). Amostra: 10,0 mL do extrato + 20 μ L de padrão misto de FB₁ e FB₂ (0,05 μ g/ μ L de cada); Lavagem: 5 mL de metanol:água (3+1); 3 mL de metanol. Para eluir: 3 vezes de 4 mL de metanol:ácido acético (99+1) e 3 mL de metanol:ácido acético (95+5) . Secagem em módulo de aquecimento a 40°C e gás nitrogênio. Fluxo mantido a 1 mL /minuto em todo o processo.

A recuperação para FB₁ foi de 88,71% (CV = 8,15%) e para a FB₂ foi de 82,53% (CV = 0,55%). As fumonisinas foram eluídas a partir da segunda fração de metanol:ácido acético (99+1) e parte significativa foi retirada da coluna SAX com a fração de 3 mL de metanol: ácido acético (95+5).

Ao modificar-se o procedimento buscando um menor volume de eluído utilizou-se na fase de eluição as seguintes variações: 15 mL solução de metanol:ácido acético (95+5) em frações de 4 mL (a última de 3 mL); 15 mL de solução de metanol:ácido acético (98+2) em frações de 4 mL (a última de 3 mL); e 12 mL de solução de metanol:ácido acético (99+1) em frações de 4 mL seguidos de 3 mL de solução de metanol:ácido acético (95+5). Somente a última variação apresentou resultado satisfatório.

Na aplicação de 15 mL solução de metanol:ácido acético (95+5) a recuperação foi negativa para FB₁ e de aproximadamente 1% para FB₂. Na aplicação da amostra controle e da amostra adicionada de fumonisina, praticamente 90% da fumonisina extraída foi eluída na primeira fração de solvente. A aplicação de 15 mL de solução de metanol:ácido acético (98+2) na fase de eluição foi testada em paralelo com o controle

de contaminação da amostra e amostra adicionada de fumonisinas de acordo com o procedimento de recuperação anteriormente aprovado. Para o método aprovado a recuperação foi de 62,7 % para FB₁ e de 77,87% para FB₂. Quanto ao procedimento modificado em 15 mL de solução de metanol:ácido acético (98+2) na fase de eluição, a concentração de FB₁ eluída representou apenas 48,6% e de FB₂ 82,6% da contaminação natural da amostra. As recuperações negativas para soluções de metanol com maiores percentuais de ácido acético podem ser consequência de uma alteração brusca de pH na eluição com relação ao pH dos solventes de lavagem.

3.3.4 Derivação

As fumonisinas FB₁ e FB₂ passam por processo de derivação formando compostos fluorescentes podendo assim, ser quantificadas na região do ultravioleta. São utilizadas mais comumente as derivações com o-ftaldialdeído (OPA) (STACK, 1998; SYDEHAM et al, 1996) ou com 2,3 – dicarboxialdeído naftaleno (NDA) (CALDAS et al, 1998; BENNETT et al, 1994; WARE et al, 1993).

A derivação com OPA é adotada pela IUPAC/ AOAC International e a derivação com NDA pode utilizar uma menor fração da amostra por apresentar resposta mais sensível (SHEPHARD, 1998). A derivação com NDA possui ainda a vantagem de estabilidade do composto fluorescente formado (resposta similar em 24 horas após reação) (BENNETT et al, 1994). Alguns autores citam a estabilidade do composto fumonisina-NDA superior a 24 horas (SHEPHARD, 1998). Na derivação com OPA o material de análise deve ser injetado no HPLC em até um minuto após a mistura dos reagentes (reagente OPA) (SHEPHARD, 1998).

Na escolha do composto de derivação primeiramente realizou-se a comparação com extratos de amostras dos diferentes tipos de produtos a serem analisados. Conforme discutido no item “Clean up”. Comparação mais simples foi possível a partir da derivação do padrão de FB₁ e a característica dos respectivos cromatogramas e resposta de repetibilidade a partir de injeções seguidas no HPLC.

TABELA 7.1 - TESTES DE RECUPERAÇÃO DA FASE DE CLEAN UP A PARTIR DE EXTRATOS EM ACETONITRILA-ÁGUA

Teste	Procedimento de clean up *	Resultados*
1	<p>Realizado para as colunas SAX (Applied Separations) e C₁₈ (Merck) com adição de 20 µL de padrão de FB₁ (0,1 µg / µL) ao solvente (1,6 mL de acetonitrila:água (1+1)): Procedimento para Coluna SPE SAX: Condicionamento da coluna: 3 mL de metanol: ácido acético (99+1), 9 x de 3 mL de acetonitrila:água (1+1). Amostra: 1,6 mL do de acetonitrila:água (1+1) + 20µL de padrão de FB₁; Lavagem: 8 mL de metanol:água (3+1); 3 mL de metanol. Para eluir: 12 mL de metanol:ácido acético (99+1). Secagem em módulo de aquecimento a 60°C e gás nitrogênio. Dos doze mililitros do eluído retirou-se 6 mL para passar pela C₁₈ e os outros 6 mL para derivação após secagem. Procedimento para Coluna C18: Extrato seco obtido da SAX diluído em 0,5 mL de metanol e 5 mL de solução de cloreto de potássio a 1%. Condicionamento da coluna: 5 mL de metanol; 5 mL de água:cloreto de potássio (99+1). Amostra: Extrato (6 de 12 mL) seco obtido da coluna SAX diluído em 0,5 mL de metanol e 5 mL de solução de cloreto de potássio a 1%. Lavagem: 5 mL de água:cloreto de potássio (99+1). Lavagem do frasco da amostra antes de passagem do solvente na coluna; 5 mL de água. Para eluir: 5 mL de acetonitrila:água (7+3). Secagem em módulo de aquecimento a 60°C e gás nitrogênio.</p>	<p>SAX: Recuperação média da FB₁ de 9,10 %. CV =33%.</p> <p>C₁₈: Recuperação média da FB₁ de 41,93%. CV =13%</p>
3	<p>Realizado para as colunas SAX (Applied Separations) e C₁₈ (Merck) com adição de 20 µL de padrão de FB₁ (0,1 µg / µL) e 20 µL de padrão de FB₂ (0,1 µg / µL) ao solvente (1,6 mL de acetonitrila:água (1+1)): Procedimento para Coluna SPE SAX: Condicionamento da coluna: 3 mL de metanol, 3 x de 3 mL de acetonitrila:água (1+1). Os doze mililitros do eluído foram secos, diluídos em 1 mL de metanol. Metade aplicado na C18 e a outra metade derivada para avaliação de recuperação da SAX. Procedimento para Coluna C₁₈: como no primeiro teste.</p>	<p>SAX: Recuperação média da FB₁ de 21,40%. CV =105%. Recuperação média da FB₂ de 27,93%. CV =102%.</p> <p>C₁₈: Recuperação média da FB₁ de 26,05%. CV =67%. Recuperação média da FB₂ de 27,4%. CV =59%</p>
4	<p>Realizado para a coluna SAX (Applied Separations) com adição de 10 µL de padrão de FB₁ (0,1 µg / µL) e 10 µL de padrão de FB₂ (0,1 µg / µL) ao solvente. Procedimento para SAX como no terceiro teste com alteração do solvente na etapa de eluir para metanol:ácido acético(95+5).</p>	<p>Recuperação média da FB₁ de 1,013%. CV =173%. Recuperação média da FB₂ de 0,29%. CV =164%.</p>

* CV = coeficiente de variação.

TABELA 7.2 - TESTES DE RECUPERAÇÃO DA FASE DE CLEAN UP A PARTIR DE EXTRATOS EM ACETONITRILA-ÁGUA

Teste	Procedimento de clean up *	Resultados
5	Realizado para a coluna SAX (Applied Separations) com adição de 10 µL de padrão de FB ₁ (0,1 µg / µL) e 10 µL de padrão de FB ₂ (0,1 µg / µL) ao solvente. Procedimento para SAX como no terceiro teste com alteração do solvente de preparo (acetonitrila:água (1+1)) e do solvente que recebe o padrão (acetonitrila:água (1+1)) para pH próximo a 6,0 por meio da adição de hidróxido de sódio 0,05M.	Sem recuperação
6	Realizado para a coluna SAX (Applied Separations) com adição de 10 µL de padrão de FB ₁ (0,1 µg / µL) e 10 µL de padrão de FB ₂ (0,1 µg / µL) ao extrato de amostra com pH ajustado em aproximadamente 6,0. Procedimento para SAX como no terceiro teste com alteração do pH do extrato e do solvente que prepara a coluna (acetonitrila:água (1+1)). Aplicaram-se dois mL do extrato na coluna.	Sem recuperação. Não foi encontrada fumonisina no extrato da amostra e no lixo após o clean up.
7	Realizado para a coluna SAX (Applied Separations) com adição de 10 µL de padrão de FB ₁ (0,1 µg / µL) e 10 µL de padrão de FB ₂ (0,1 µg / µL) ao extrato da amostra. Foi realizado teste em paralelo com extrato da amostra em metanol:água e com extrato da amostra com acetonitrila:água. Procedimento para Coluna SPE SAX aplicando extrato com acetonitrila:água: Condicionamento da coluna: 5 mL de metanol; 5 mL de acetonitrila:água (1+1) com pH corrigido para 6,0. Amostra: 2,0 mL do extrato em acetonitrila:água (1+1) com pH corrigido para 6,0 + 10µL de padrão de FB ₁ e 10µL de padrão de FB ₂ ; Lavagem: 5 mL de metanol:água (3+1); 3 mL de metanol. Para eluir: 10 mL de metanol:ácido acético (99+1). Secagem em módulo de aquecimento a 60°C e gás nitrogênio. Procedimento para Coluna SPE SAX aplicando extrato com metanol:água: modificaram-se as etapas de preparo e aplicação da amostra, empregando-se 5 mL de metanol e 5 mL de metanol:água(3+1). Amostra: 2,0 mL do extrato em metanol:água (3+1) + 10µL de padrão de FB ₁ e 10µL de padrão de FB ₂ . Repetiu-se o teste para extrato de outra amostra, pipoca ao invés de fubá, pois a primeira apresentava contaminação insignificante quando comparada à segunda. Procedeu-se como citado acima ajustando o pH do extrato em metanol para aproximadamente 6,0 e o pH do extrato em acetonitrila para aproximadamente 6,5.	Sem recuperação. Não foi encontrada fumonisina no extrato da amostra e no lixo após o clean up. Não houve diferença na substituição do solvente de extração da amostra.
8	Realizaram-se testes com solvente adicionado de fumonisinas, extrato da amostra e com extrato da amostra adicionado de fumonisinas. Procedimento para Coluna SPE SAX (Applied Separations) aplicando extrato com acetonitrila:água: Condicionamento da coluna: 5 mL de metanol; 5 mL de metanol:água (1+1). Amostra: 2,0 mL do extrato em acetonitrila:água (1+1) + 10µL de padrão de FB ₁ e 10µL de padrão de FB ₂ ; Lavagem: 5 mL de metanol:água (3+1); 3 mL de metanol. Para eluir: 10 mL de metanol:ácido acético (99+1). Secagem em módulo de aquecimento a 60°C e gás nitrogênio. Procedimento para Coluna SPE SAX aplicando extrato com metanol:água: modificaram-se as etapas de preparo e aplicação da amostra, empregando-se 5 mL de metanol e 5 mL de metanol:água(3+1). Amostra: 2,0 mL do extrato em metanol:água (3+1) + 10µL de padrão de FB ₁ e 10µL de padrão de FB ₂ .	Sem recuperação. Não foi encontrada fumonisina no extrato da amostra e no lixo após o clean up. Não houve diferença na substituição do solvente de extração da amostra.

TABELA 8 – COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MARCAS DE COLUNA A PARTIR DE EXTRATOS EM ACETONITRILA-ÁGUA DE AMOSTRAS NATURALMENTE CONTAMINADAS

Marca da SPE SAX	Preparo Coluna	Amostra	Lavagem	Eluído	Secagem	Padrão Controle	Contaminação (mg.kg ⁻¹)		Recuperação*
							FB ₁	FB ₂	FB ₁
Applied Separations	5 mL de metanol; 5 mL de acetonitrilal:água (1+1) pH ajustado para 5,0	5 mL do extrato (acetonitrilal:água (1+1)) Amostra de fubá** naturalmente contaminada extraída em semanas anteriores	5 mL de metanol:água (3+1); 3 mL de metanol.	1 x 5mL metanol:ácido acético (99+1).	Módulo de aquecimento a 40°C e gás nitrogênio (superior a 60 minutos)	Seco em 5mL metanol: ácido acético + 1 mL metanol a 40°C e nitrogênio	0,358	nd	<i>Recuperação** de 12,3% para FB₁</i> <i>CV = 35%</i>
							0,333	nd	
							0,170	nd	
Merck							0,333	nd	<i>Recuperação** de 10,7% para FB₁</i> <i>CV = 31%</i>
							0,244	nd	
							0,176	nd	
Applied Separations	5 mL de metanol; 5 mL de acetonitrilal:água (1+1) pH ajustado para 5,0	5 mL do extrato (acetonitrilal:água (1+1)) Amostra de fubá** naturalmente contaminada Clean up no mesmo dia da extração	5 mL de metanol:água (3+1); 3 mL de metanol.	3 x 3mL metanol:ácido acético (99+1).	Módulo de aquecimento a 40°C e gás nitrogênio (30 minutos)	Seco em 3mL metanol: ácido acético a 40°C e nitrogênio	0,029	nd	<i>Recuperação** de 1,7% para FB₁</i> <i>CV = 65%</i>
							0,020	nd	
							0,071	nd	
Merck							0,412	nd	<i>Recuperação** de 10% para FB₁</i> <i>CV = 65%</i>
							0,170	nd	
							0,124	nd	

* CV = coeficiente de variação. ** A amostra utilizada apresentava contaminação natural de 2,334 mg.kg⁻¹ de FB₁ e 0,481 mg.kg⁻¹ de FB₂. Nd = não detectada

TABELA 9 – COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA COLUNA SAX A PARTIR DE SOLVENTE+FUMONISINAS, EXTRATO EM ACETONITRILA-ÁGUA DE AMOSTRA NATURALMENTE CONTAMINADA E EXTRATO EM ACETONITRILA-ÁGUA DE AMOSTRA NATURALMENTE CONTAMINADA+FUMONISINAS.

Preparo Coluna	Amostra	Lavagem	Eluído	Secagem	Padrão Controle	Recuperação*		Média*	
						FB ₁	FB ₂	FB ₁	FB ₂
5 mL de metanol; 5 mL de acetoneitrila:águ a (1+1) pH ajustado para 5,0	5 mL do extrato (acetoneitrila:águ a (1+1)) Amostra de fubá naturalmente contaminada Clean up no mesmo dia da extração	5 mL de metanol:águ a (3+1); 3 mL de metanol.	2 x 4 mL metanol:ácido acético (99+1).	Módulo de aquecimento a 40°C e gás nitrogênio (50 minutos)	Seco em 4mL metanol: ácido acético a 40°C e nitrogênio	0,331	0,121	<i>Contaminação:</i> 0,218 <i>CV = 44,6%</i>	<i>Contaminação:</i> 0,08 <i>CV = 45,6%</i>
						0,171	0,068		
						0,154	0,051		
5 mL de metanol; 5 mL de acetoneitrila:águ a (1+1) pH ajustado para 5,0	5 mL do extrato (acetoneitrila:águ a (1+1))+ FB (20 µL padrão misto***: 0,05 µg/µL) Clean up no mesmo dia da extração	5 mL de metanol:águ a (3+1); 3 mL de metanol.	2 x 4 mL metanol:ácido acético (99+1).	Módulo de aquecimento a 40°C e gás nitrogênio (50 minutos)	Seco em 4mL metanol: ácido acético a 40°C e nitrogênio	133,4	72,1	<i>Recuperação:</i> 68,4 <i>CV = 91,4%</i>	<i>Recuperação:</i> 38,0 <i>CV = 89,9%</i>
						63,2	38,3		
						8,6	3,7		
5 mL de metanol; 5 mL de acetoneitrila:águ a (1+1) pH ajustado para 5,0	5 mL de acetoneitrila:águ a (1+1) pH ajustado para 5,0 + FB (20 µL padrão misto***: 0,05 µg/µL)	5 mL de metanol:águ a (3+1); 3 mL de metanol.	2 x 4 mL metanol:ácido acético (99+1).	Módulo de aquecimento a 40°C e gás nitrogênio (50 minutos)	Seco em 4mL metanol: ácido acético a 40°C e nitrogênio	1,9	2,3	<i>Recuperação:</i> 1,1 <i>CV = 58,7%</i>	<i>Recuperação:</i> 1,4 <i>CV = 49,3%</i>
						0,8	1,1		
						0,7	1,0		

* Para o extrato contaminado a informação da célula corresponde à contaminação da amostra. *Recuperação (%) ou contaminação (mg.kg⁻¹). CV = coeficiente de variação. ***O padrão passou a ser utilizado na forma de solução mista de FB₁ + FB₂ para uma melhor padronização dos processos de enriquecimento e recuperação.

Enquanto os testes de derivação do padrão com OPA foram baseados na etapa correspondente do método de quantificação de fumonisinas da AOAC, os testes de derivação com NDA foram iniciados a partir dos trabalhos de Ware et al. (1993) e Bennett et al. (1994) e aperfeiçoados com base no estudo de Caldas et al. (1998). O principal fato a ser mencionado tem relação com a qualidade inicial dos cromatogramas de derivação com NDA que se apresentavam com grande quantidade de interferentes próximos ao tempo de retenção da FB₁. De acordo com Caldas et al. (1998) a concentração de alguns reagentes necessária para efetiva derivação das fumonisinas chegava a ser 10 vezes menor do que as aplicadas por Ware et al. (1993) e Bennett et al. (1994). Realizada a redução proporcional destas concentrações foi possível obter cromatogramas de melhor qualidade.

Procedimento adotado para derivação com NDA (FIGURA 19):

AMOSTRA: após obtenção do extrato seco o mesmo é diluído em 500 µL de metanol. Os reagentes são misturados obedecendo a seguinte ordem: 1º) 260 µL tampão; 2º) 170 µL cianeto de potássio; 3º) 50 µL de NDA. Quantidade de amostra injetada: 0,25 mg/µL.

BRANCO: Os reagentes são misturados obedecendo a seguinte ordem: em 500 µL metanol são adicionados: 1º) 260 µL tampão; 2º) 170 µL cianeto de potássio; 3º) 50 µL de NDA.

PADRAO: Os reagentes são misturados obedecendo a seguinte ordem: a 490 µL metanol adicionados de 10 µL padrão FB₁ são adicionados: 1º) 260 µL tampão; 2º) 170 µL cianeto de potássio; 3º) 50 µL de NDA.

Após mistura dos reagentes em frasco com capacidade de 4 mL, o último recebe parafilme para vedação e é coberto com folha de papel alumínio. Para derivação aplicou-se aquecimento em módulo a 60°C por 15 minutos. Após resfriamento, o volume era completado para 4 mL com solução tampão (3.020 µL). O material então podia ser injetado no HPLC com auxílio de uma seringa graduada de 50 µL com tempo de até 24 horas após a derivação.

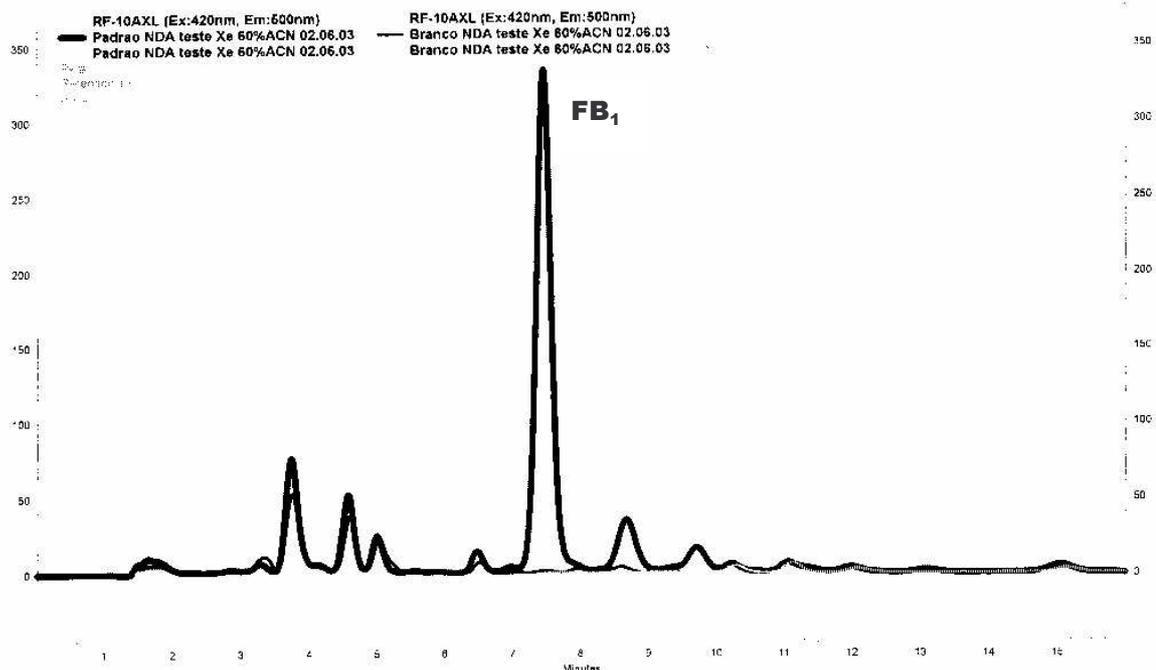


FIGURA 19 – CROMATOGRAMA DA FB₁: DERIVADA COM NDA. EM LINHA MAIS ESTREITA O CROMATOGRAMA DOS REAGENTES (BRANCO). CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL INJETADO: PADRÃO FB₁ EM 0,25 ng/μL (TEMPO DE RETENÇÃO: 7,4 MINUTOS)

Procedimento adotado para derivação com OPA (FIGURA 20):

BRANCO: Os reagentes eram misturados obedecendo a seguinte ordem: 1^o) 50 μL acetonitrila:água (1+1); 2^o) 200 μL do reagente OPA.

PADRAO: A solução padrão de FB₁ utilizada era de 0,01 μg/μL, elaborada a partir de 10 μL de padrão 0,1 μg/μL e 990 μL de acetonitrila - água (1+1). Os reagentes eram misturados obedecendo a seguinte ordem: 1^o) 25 μL acetonitrila:água (1+1); 2^o) 25 μL padrão FB₁; 3^o) 200 μL do reagente OPA.

AMOSTRA: a amostra seca após clean up era diluída em 200 μL de acetonitrila:água (1+1). A uma alíquota de 50 μL desta solução eram adicionados 200 μL do reagente OPA. Quantidade de amostra injetada: 1 mg/μL;

A mistura após agitação era injetada no HPLC com auxílio de seringa graduada de 50 μL com tempo máximo de 1 minuto após mistura.

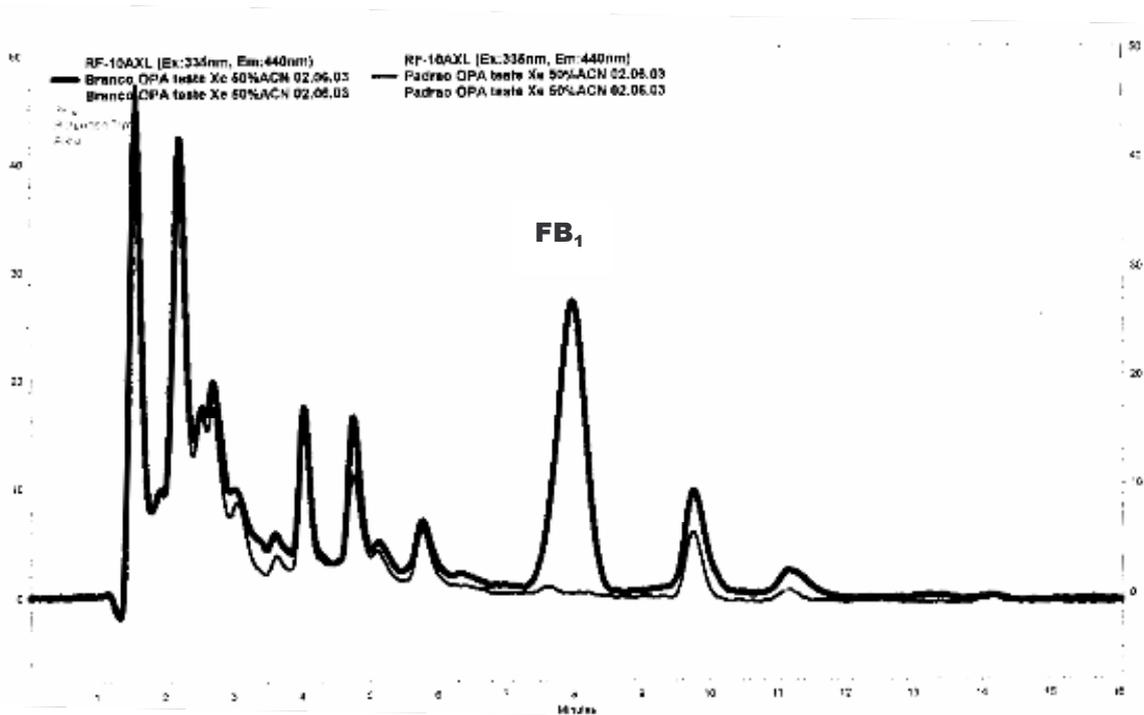


FIGURA 20 – CROMATOGRAMA DA FB₁: DERIVADA COM OPA. EM LINHA MAIS ESTREITA O CROMATOGRAMA DOS REAGENTES (BRANCO). CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL INJETADO: PADRÃO FB₁ EM 0,4 ng/μL (TEMPO DE RETENÇÃO: 8 MINUTOS).

A escolha do NDA para derivação se deu em decorrência de sua maior fluorescência e estabilidade após a sua formação.

Em função da maior quantidade de ácido acético pra eluição aplicada no procedimento de clean up aprovado, modificou-se a quantidade de tampão de tetraborato de sódio 0,05 M de 260 μL para 480 μL, garantindo a faixa ideal de pH para a reação de derivação. Desta forma, a mistura derivada após resfriamento era então adicionada de 2.800 μL de tampão para completar os 4 mL finais.

Para garantir o limite de detecção das amostras de snacks em mesma concentração que o das outras amostras (utiliza-se 12,5 g de snack ao invés de 25 g para extração), após a derivação, o volume final e completado para 2 mL e não para 4 mL com tampão.

3.3.5 Condições de trabalho para HPLC

Na seleção de solventes de trabalho do HPLC preocupou-se em utilizar a acetonitrila como parte da fase móvel já que as diversas metodologias implantadas

pelos Laboratórios de Micotoxinas, Aditivos e Resíduos de Pesticidas do LACEN – DF, utilizam este mesmo solvente na rotina de operação do HPLC.

Para uma boa separação em coluna de fase reversa a fase móvel deve ter seu pH ajustado de acordo com a característica básica ou ácida do composto analisado. Na análise de fumonisinas a fase móvel deverá apresentar característica ácida, utilizando solução tampão fosfato pH 3,5 ou ácido acético (CIOLA, 1998). Preferiu-se o ácido acético pela praticidade no preparo da fase móvel e na operação de limpeza do HPLC após análise das amostras. O mesmo foi adicionado à água em concentração de 2,5 a 3%, concentração definida com base no gradiente acetonitrila-água. A característica ácida do solvente garante uma maior interação das fumonisinas com o grupo alquil da coluna C₁₈, já que as funções ácidas dos grupos tricarbóxicos da molécula permanecem protonados. Do contrário, a função ácida desprotonada pode interagir com grupos silanóis não cobertos da coluna C₁₈, levando à deformação dos picos correspondentes a FB₁ e FB₂.

A fase móvel ficou definida como constituída de acetonitrila e água acidificada com ácido acético. O melhor gradiente destes solventes foi identificado a partir do fato da acetonitrila ser mais apolar que o metanol. O metanol geralmente é utilizado numa proporção de 80:20 v/v de tampão (TABELAS 5.1, 5.2 e 5.3). Testes com padrão FB₁ foram realizados para definir o melhor cromatograma em função dos possíveis gradientes acetonitrila-água acidificada.

Os comprimentos de onda de excitação para o detector de fluorescência são estabelecidos de acordo com as maiores respostas de absorvância das fumonisinas derivadas (WARE et al., 1993). Desta forma fumonisinas derivadas com OPA possuem comprimentos de onda de excitação e emissão diferenciados das fumonisinas derivadas com NDA. Para OPA utiliza-se 335 nm de excitação e 440 nm de emissão e para NDA 420 nm de excitação e 500 nm de emissão na detecção das fumonisinas FB₁ e FB₂ (TABELAS 5.1, 5.2 e 5.3).

Para a FB₁ derivada com OPA definiu-se as seguintes condições: fluxo de 1 mL /min; fase móvel com acetonitrila:água acidificada com 2,5% de ácido acético (50:50); detector de fluorescência: excitação de 335 nm e emissão de 440 nm.

Para a FB₁ derivada com NDA definiu-se as seguintes condições de trabalho: fluxo de 1 mL /min; fase móvel com acetonitrila:água acidificada com 2,5% de ácido acético (60:40); detector de fluorescência: excitação de 420 nm e emissão de 500 nm.

As condições de trabalho do HPLC foram modificadas em função da inclusão da avaliação da fumonisina FB₂ numa fase posterior do trabalho. A grande maioria dos autores não utiliza mudança de gradiente, talvez pelo inconveniente de se ter que aguardar a normalização da pressão de trabalho entre as injeções de material, mas esta medida foi necessária para evitar-se a deformação do pico da FB₂ no cromatograma. Nas condições anteriormente adotadas (acetonitrila:água acidificada com 2,5% de ácido acético (60:40)) a FB₂ apresentou tempo de retenção de aproximadamente 14 minutos e com ligeira deformação do pico, o que poderia prejudicar a sua quantificação.

3.3.6 Curva Padrão

A primeira curva padrão foi preparada com as seguintes concentrações injetadas (massa/ μ L): 0,005 ng; 0,010 ng; 0,025 ng; 0,075ng; 0,125 ng; 0,250 ng. A primeira concentração da curva não poderia ser quantificada para FB₂ e em função das contaminações encontradas nas primeiras análises de amostras a última concentração era inferior a desejável. A segunda curva padrão foi elaborada observando-se as modificações necessárias, considerando 0,010 ng/ μ L (64 μ g / kg de amostra) como primeiro ponto e acrescentando duas concentrações superiores a 0,250 ng/ μ L (1.600 μ g / kg de amostra), 0,500 ng/ μ L(3.200 μ g / kg de amostra). Em curvas posteriores incluiu-se o ponto de 1,000 ng/ μ L(6.400 μ g / kg de amostra).

Para os primeiros pontos da curva foi preparada solução de 1 ng/ μ L a partir da solução 0,05 μ g/ μ L e para a outra metade dos pontos retirava-se alíquotas diferenciadas da solução padrão (0,05 μ g/ μ L).

Todas as alíquotas correspondentes às concentrações da curva são secas em frascos com capacidade de 5 mL a 40 °C sob nitrogênio antes da derivação.

3.4 CÁLCULO DA INGESTÃO DE FUMONISINAS

Analisadas as amostras, a ingestão de FB₁ e FB₂ foi calculada a partir da equação “Ingestão = $\sum [C \text{ (mg.kg}^{-1}) \times A \text{ (kg/dia)}] / \text{Peso corpóreo (kg)}$ ”, onde **C** é a concentração de micotoxina no alimento e **A** é o consumo do alimento (o consumo do alimento foi obtido do IBGE (2004).

A ingestão calculada foi comparada aos parâmetros toxicologicamente aceitos, previstos pela Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE

4.1.1 Extração para diferentes produtos de milho

Foram definidos quatro diferentes processos de extração (TABELA 10) de acordo com a amostra a ser avaliada, sempre com agitação por 30 minutos e filtragem em filtro de papel:

TABELA 10 – CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PARA DIFERENTES TIPOS DE AMOSTRA

Alimento	Fumonisinas Avaliadas	Amostra	Solvente de Extração
Milho verde, milho verde congelado, milho em conserva	B ₁	25 g	2,5 g de NaCl + 50 mL metanol-água (4:1 v/v)
Cornflakes	B ₁ e B ₂	25 g	100 mL metanol-tampão tetraborato de sódio 0,4M pH 9,2 (3:1 v/v)
Fubá, creme de milho, flocos de milho, farinha de milho, milho para pipoca	B ₁ e B ₂	25 g	100 mL metanol-água (3:1 v/v) com pH aparente da solução corrigido para 6,0
Salgadinhos de milho	B ₁ e B ₂	12,5 g	100 mL metanol-água (3+1 v/v) com pH aparente da solução corrigido para 6,0

4.1.2 Validação da etapa de clean up

O procedimento de clean up foi padronizado da seguinte forma:

- Extração da amostra: 50 gramas de amostra em agitação por 30 minutos com 100 mL de metanol:água (3+1). Filtragem em papel de filtro;
- Ajuste de pH do extrato para a faixa de 5,8 a 6,5 com hidróxido de sódio 0,5M;
- Procedimento de clean up: Condicionamento da coluna: 5 mL de metanol; 5 mL de metanol:água (1+1). Amostra: 10 mL do extrato; Lavagem: 5 mL de metanol:água (3+1); 3 mL de metanol. Para eluir: 12 mL de metanol:ácido acético

(99+1) e 4 mL de metanol:ácido acético (95+5) . Secagem de alíquota de 4 mL do eluído em módulo de aquecimento a 40°C e gás nitrogênio. Fluxo mantido ao máximo de 1 mL /minuto em todo o processo.

No controle do volume de eluído recolhido em função da utilização de apenas ¼ deste volume para seqüência da análise (secagem a 40°C sob fluxo de gás nitrogênio), a variação de volume apresentada foi \leq que 4% ao se trabalhar com 16 mL de eluído, com CV = 0,86%.

Para o método aprovado o primeiro teste de recuperação para FB₁ foi de 88,71% (CV = 8,15%) e para a FB₂ foi de 82,53% (CV = 0,55%). No segundo teste de recuperação foi de 62,7 % para FB₁ e de 77,87% para FB₂.

4.1.3 Aplicação de colunas SPE SAX de diferentes marcas

Nos testes de recuperação de diferentes marcas de coluna SPE SAX, mostrou-se que outras marcas além da Variam poderiam ser utilizadas (TABELA 11). O coeficiente de variação entre a média das concentrações encontradas para cada marca de SPE SAX foi de 2,66% para FB₁ e de 3,29% para FB₂.

Como se observou diferença de vazão entre as diferentes marcas, não se deve empregá-las juntas em um mesmo clean up.

TABELA 11 - COMPARAÇÃO DE RECUPERAÇÃO E REPRODUTIBILIDADE ENTRE DIFERENTES MARCAS DE COLUNA SPE SAX.

Marca	CV (%)		Contaminação encontrada no extrato (valor médio em mg.kg ⁻¹)		Observações
	FB ₁	FB ₂	FB ₁	FB ₂	
Varian	6,61	5,46	1,653	1,082	-
Merck	6,42	1,52	1,604	1,172	CV e média obtidos de apenas dois resultados. Não foi detectada fumonisina na terceira no clean up resultante da terceira coluna.
Applied separations	23,7	37,7	1,712	1,140	-
	5,13	4,81	1,993	1,288	Valores obtidos se descartada a recuperação de uma das três colunas

NOTA: Aplicaram-se em todas as colunas alíquotas de um mesmo extrato de amostra naturalmente contaminada. Trabalhou-se com um fluxo máximo de 1 mL/minuto (SYDENHAM et al., 1992). Mesmo assim notou-se que uma das colunas Merck atingiu fluxo um pouco superior que levou a resultado posterior muito inferior ao esperado.

4.1.4 Estabilidade do derivado NDA-FB

A FIGURA 21 mostra cromatogramas das fumonisinas derivadas com NDA com diferentes tempos decorridos da derivação até a injeção no HPLC. Após derivação este padrão de controle foi mantido em temperaturas de aproximadamente -4°C durante os intervalos de aplicação no HPLC. Nestas condições as respostas de fluorescência com o decorrer do tempo eram muito próximas da inicial. O coeficiente de variação entre as áreas referentes a FB₁ e FB₂ com a injeção do mesmo padrão no dia da derivação e com 9, 13, 15 e 18 dias após derivação foi de 11,8% e 13,5% respectivamente. Foi observada redução da resposta principalmente da FB₂ próxima ao período de um mês

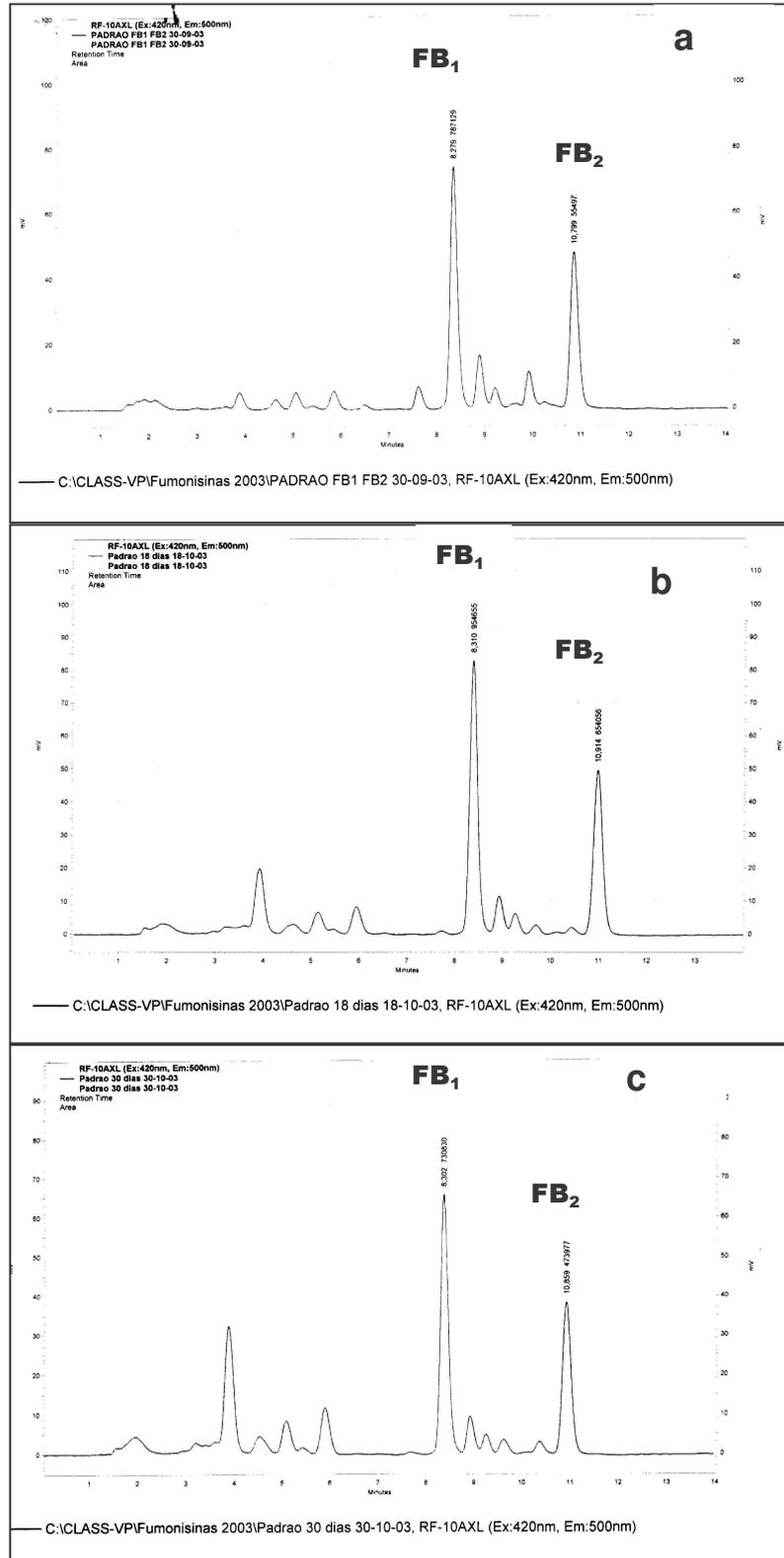
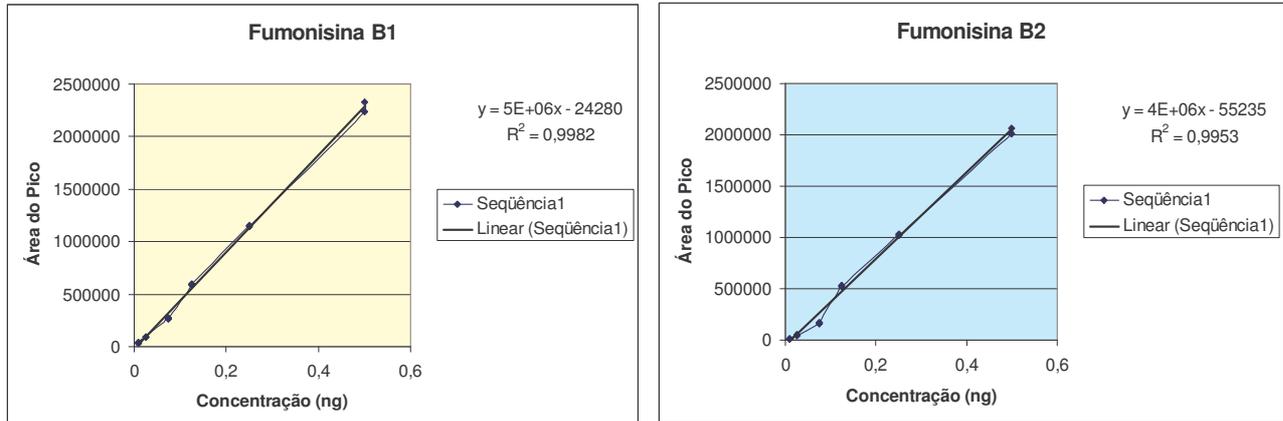


FIGURA 21 – CROMATOGRAMAS DAS FUMONISINAS B₁ E B₂: RESPOSTA DO MESMO CONTROLE DO PADRÃO EM PERÍODO SUPERIOR A 24 HORAS DE DERIVAÇÃO (a). PRIMEIRO DIA, 18 DIAS APÓS DERIVAÇÃO (b) E 30 DIAS APÓS DERIVAÇÃO (c).

4.1.5 Curva Padrão

Segue ilustração de curva padrão utilizada para quantificação de fumonisinas (FIGURA 22). Todas as curvas padrão utilizadas foram avaliadas pelo Teste de Análise Bivariada com coeficiente de determinação $R^2 \geq 0,99$.



Concentração (ng)	Área do pico
0,01	33795
0,01	43982
0,025	87843
0,025	90727
0,075	269560
0,075	264050
0,125	583248
0,125	592338
0,25	1151499
0,25	1148035
0,5	2239433
0,5	2325105

Concentração (ng)	Área do pico
0,01	15690
0,01	11444
0,025	49152
0,025	39677
0,075	162333
0,075	173300
0,125	536784
0,125	524113
0,25	1036280
0,25	1018321
0,5	2014230
0,5	2059814

FIGURA 22 – CURVA PADRÃO FB₁ (DIREITA) E CURVA PADRÃO FB₂ (ESQUERDA).

4.1.6 Condições de Trabalho do HPLC

Definida a derivação com NDA e devido à inclusão da FB₂ as condições de trabalho do HPLC passaram a ser: fluxo de 1 mL /min; fase móvel com acetonitrila:água acidificada com 2,5% de ácido acético, 55:45 v/v aos 0 minutos, 80:20 v/v aos 5 minutos e 55:45 v/v aos 8 minutos; detector de fluorescência com excitação de 420 nm e com emissão de 500 nm. Nestas condições o tempo de

retenção da FB₁ foi de 8,3 minutos e o da FB₂ de 10,9 minutos (FIGURA 23 e FIGURA 24). Com estas condições foi estabelecido o tempo de corrida para cada injeção de 14 minutos (tempo necessário para saída de interferentes e normalização da pressão de trabalho).

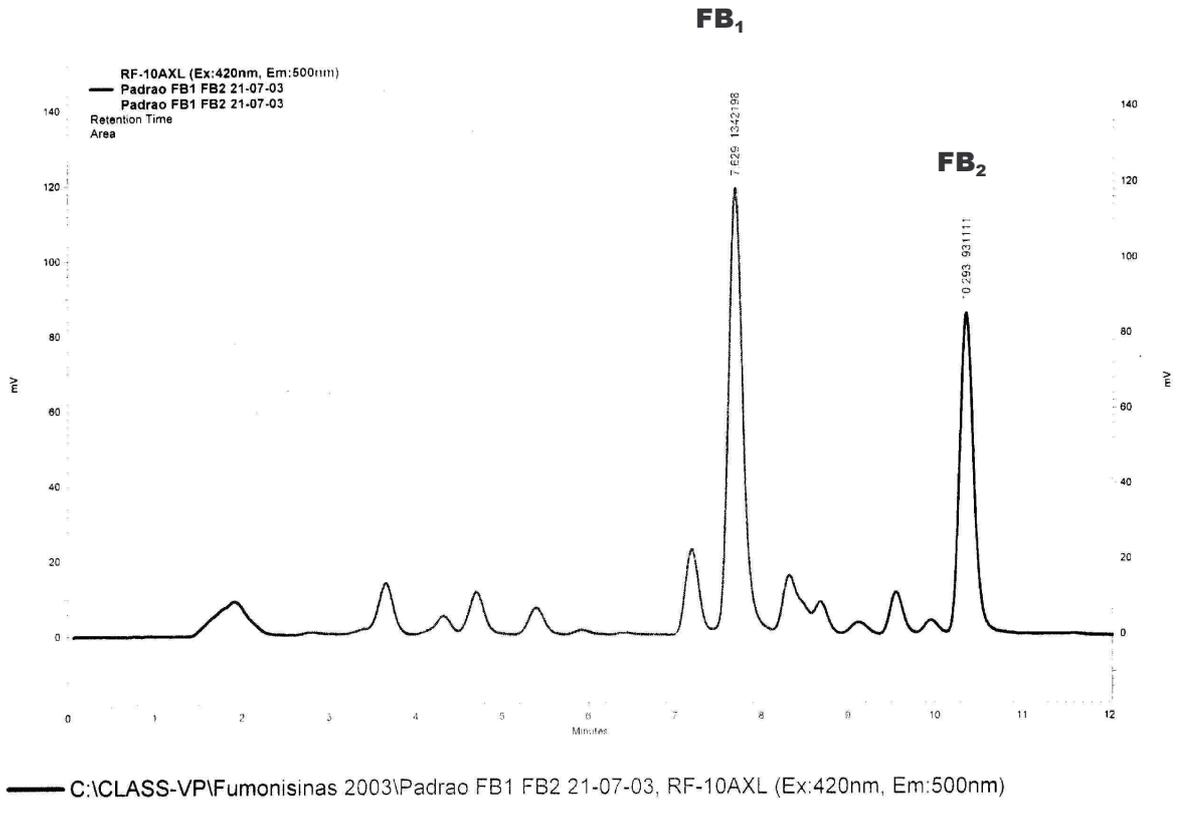


FIGURA 23 – CROMATOGRAMA DAS FUMONISINAS FB₁ E FB₂ DERIVATIZADAS COM NDA E NAS CONDIÇÕES DE TRABALHO DESCRITAS PARA O HPLC.

O gradiente foi ainda modificado em função da troca da coluna C₁₈ de maior comprimento e posteriormente devido à mudança do aparelho HPLC utilizados na validação das amostras.

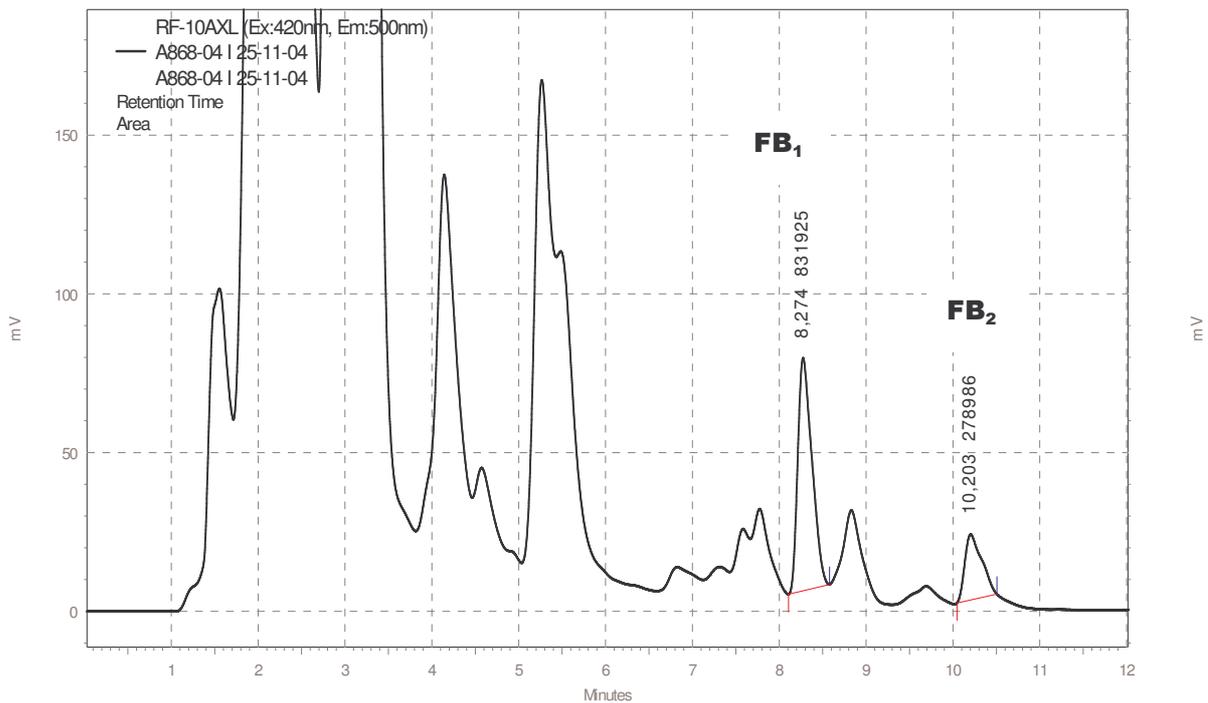


FIGURA 24 – CROMATOGRAMA DE AMOSTRA DE FLOCOS DE MILHO COM CONTAMINAÇÃO DE 1,6 mg/kg (FB₁+ FB₂).

Para as amostras de farinha de milho foi necessária a modificação das condições de funcionamento do aparelho HPLC devido ao aparecimento de um interferente anterior a FB₁ que prejudicava a sua quantificação. Nem todas as amostras de farinha de milho apresentam este interferente, motivo pelo qual as condições anteriormente definidas eram consideradas ideais. Para esta separação foi necessário aumentar a polaridade da fase móvel diminuindo a proporção de acetonitrila. Isto permitiu a separação do interferente mais aumentou em muito o tempo de corrida. Para evitar a deformação excessiva do pico da FB₂ utilizou-se mudança de gradiente durante a corrida, aumentado a quantidade de acetonitrila para que depois retornasse a proporção inicial. Após testes da melhor concentração inicial de acetonitrila, realizaram-se testes das possíveis mudanças de gradiente durante a corrida até chegar à obtenção de pico da FB₂ que pudesse ser quantificado (FIGURA 25). As amostras de farinha de milho passaram a ser analisadas a partir das seguintes modificações com relação às especificações anteriores: fase móvel constituída de acetonitrila-água acidificada a 3% com ácido acético(45:55 v/v) com mudança de

gradiente da fase móvel: início da corrida com 45% de acetonitrila, aos 5 minutos 70 % de acetonitrila e aos 18 minutos 45% de acetonitrila. Tal modificação aumenta o tempo de corrida de 14 minutos para 23 minutos.

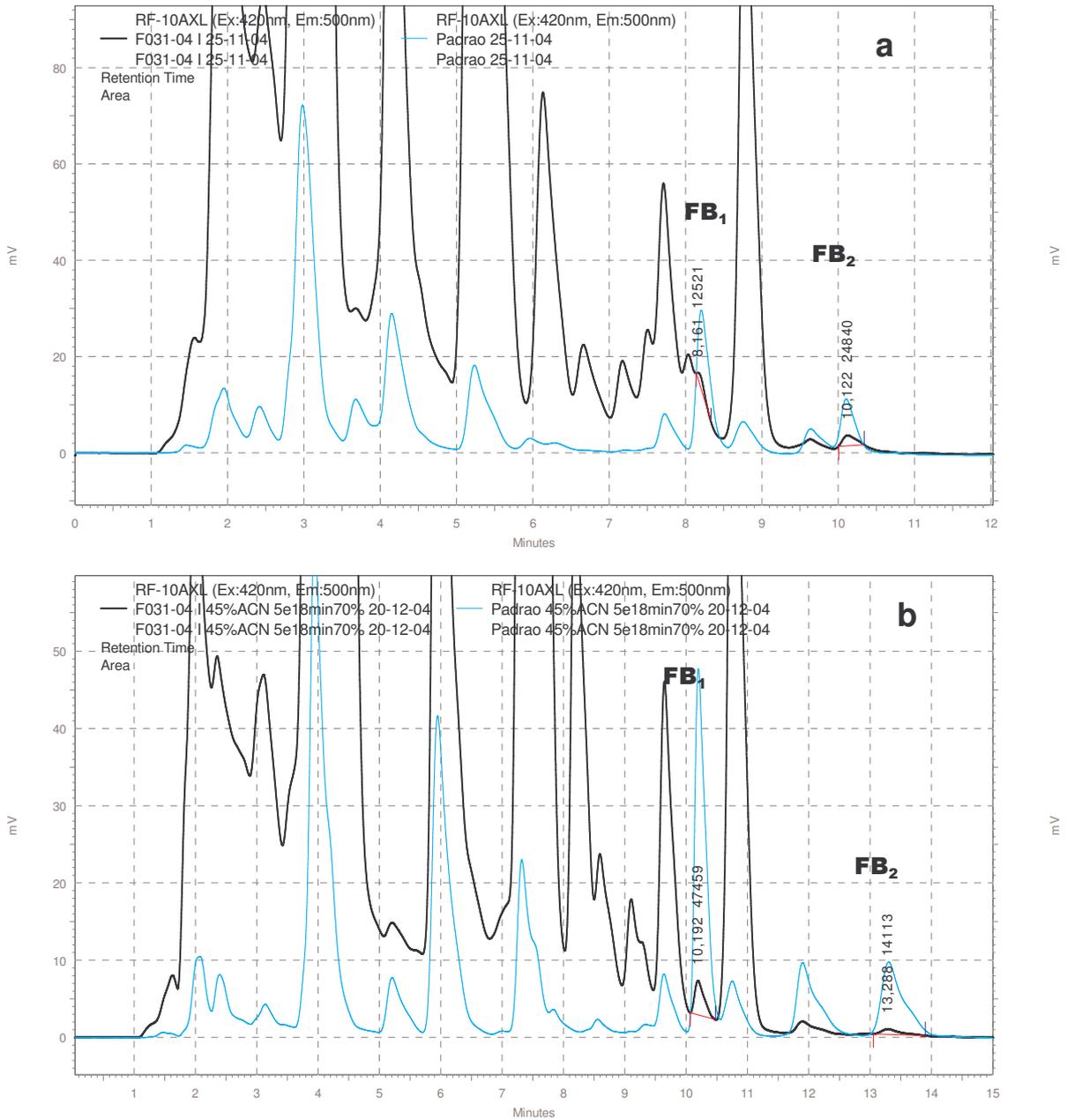


FIGURA 25 – ANÁLISE DE AMOSTRA DE FARINHA DE MILHO NAS CONDIÇÕES DO HPLC DEFINIDAS PARA OS OUTROS PRODUTOS (a) E SOB NOVAS CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA ESPECIALMENTE PARA O PRODUTO (b).

4.1.7 Validação da Metodologia

Na validação do método foi realizada a recuperação de fumonisinas FB₁ e FB₂ para as amostras de milho de pipoca, fubá, snacks, cornflakes e milho enlatado. As amostras de farinha de milho, flocos de milho e creme de milho tem características semelhantes ao fubá, não se realizando recuperação para cada um desses produtos especificamente. O mesmo foi considerado para as amostras de milho verde e milho congelado em relação ao milho enlatado. Os testes de recuperação foram realizados em triplicata considerando-se 70% como valor mínimo aceitável obtido das médias (CASS & DEGANI, 2001). Na TABELA 12 são encontrados os valores de recuperação para cada produto em três diferentes concentrações de enriquecimento. As respectivas metodologias de quantificação estão resumidas na FIGURA 26.

De acordo com Leite (2002) o CV dos resultados considerado pela União Européia na validação de um método em um laboratório pode variar de 10 a 30 % dependendo da concentração avaliada. O valor de 10% seria aceito para concentrações de 1 mg.kg⁻¹, 16% para 100 µg/kg, 21% para 10µg/kg e de 30% para 1µg/kg.

Nos testes de recuperação do padrão em diferentes matrizes, foram obtidos coeficientes de variação (TABELA 12) coerentes com recomendação da União Européia o que sugere uma boa repetibilidade do método.

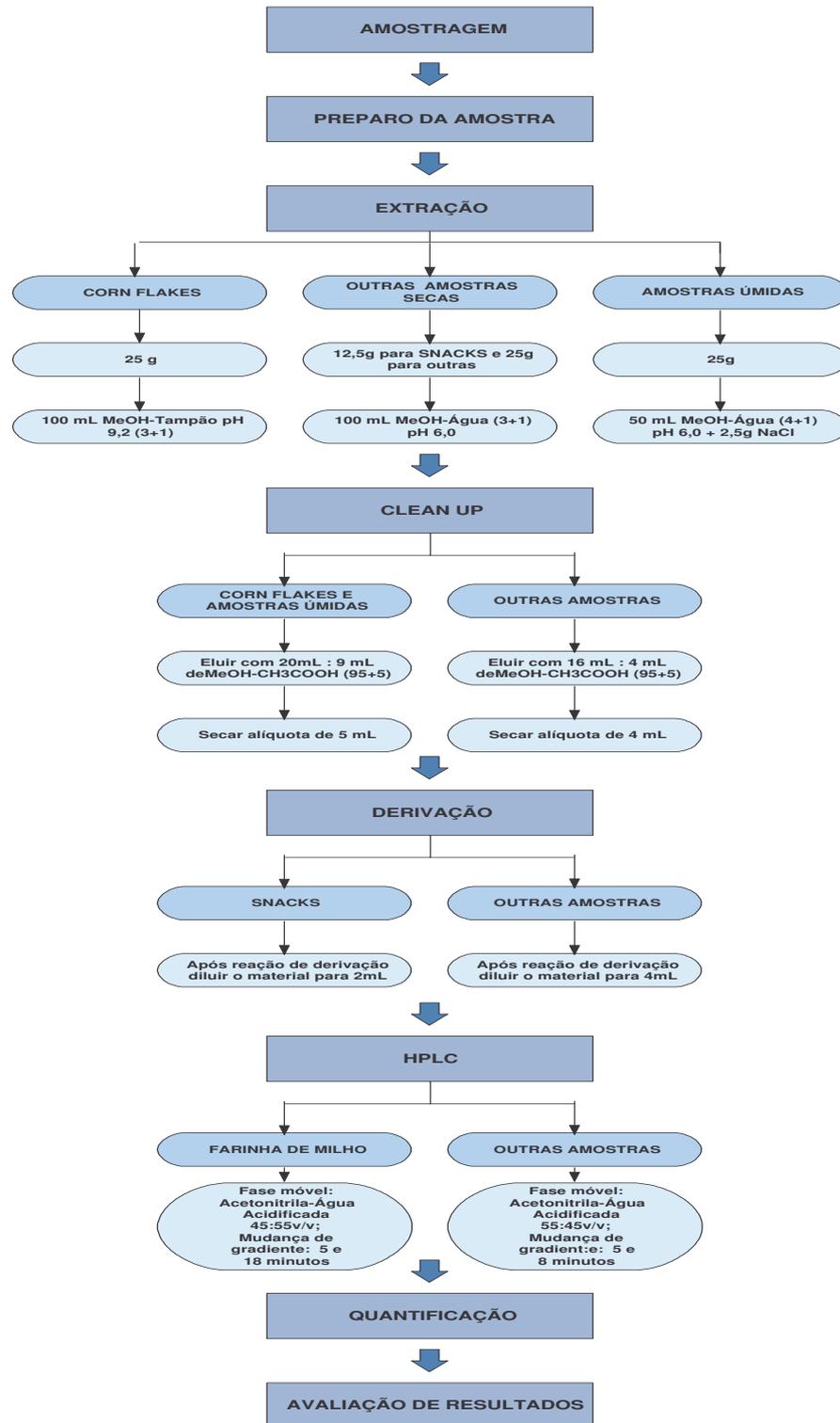


FIGURA 26 – FLUXOGRAMA RESUMIDO DAS METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS FB1 E FB2 VALIDADAS PARA OS PRODUTOS A BASE DE MILHO ANALISADOS.

TABELA 12 – VALORES DE RECUPERAÇÃO NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS FB1 E FB2 PARA MILHO DE PIPOCA, FUBÁ, SNACKS, CORNFLAKES E MILHO ENLATADO E RESPECTIVOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO.

Produto	Concentração de Fumonisina Adicionada (µg/kg)	Recuperação* (%)		Coeficiente de Variação (%)		Contaminação Natural do Produto (µg/kg)	
		FB ₁	FB ₂	FB ₁	FB ₂	FB ₁	FB ₂
Milho para pipoca	64	59,5	107,5	8,9	11,8	270	142
	480	74	112	1,5	10,6		
	1.600	66,4	79,6	4,0	3,8		
Fubá	64	0	112,2	1,9	5,7	896	320
	480	59,3	115,1	**3,0	**3,8		
	1.600	70,5%	84,5	**2,5	**4,6		
Snacks	128	92	94	32,5	24,4	330	225
	960	85,4	95,7	6,1	14,8		
	1600	67,6	85,7	**2	10		
Cornflakes	64	203	110	18,8	0,3	172	78
	480	95,7	94	11,4	5,8		
	800	86,8	83,8	**3,8	**0,5		
Milho enlatado	32	0	-	21,3	-	441	-
	240	78,5	-	*8,1	-		
	800	68	-	**8,4	-		

Valores médios das triplicatas. ** O CV em alguns casos ultrapassou o limite recomendado para validação (10% para concentrações de 1 mg/kg, 16% para 100 µg/kg, 21% para 10µg/kg e de 30% para 1µg/kg, mas não em todas as concentrações de enriquecimento da mesma amostra. Eliminada as medidas de maior desvio, os desvios médios relativos entre as duas restantes foram inferiores a 5%, sendo a média de recuperação nesta concentração calculada a partir destes dois valores. A contaminação natural das amostras de fubá (896 µg/kg para FB₁ e 320 µg/kg para FB₂) e de pipoca (179 µg/kg para FB₁ e 98 µg/kg para FB₂) somadas ao padrão adicionado para recuperação atribuíram na maioria dos casos uma contaminação superior a 1 mg.kg⁻¹.

4.2 CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS FB₁ E FB₂ EM PRODUTOS DE MILHO

A TABELA 13 resume as concentrações de fumonisinas encontradas nas 207 amostras de produtos de milhos coletadas no comércio local do Distrito Federal analisadas utilizando as metodologias validadas descritas anteriormente. Os resultados detalhados (por amostra) podem ser consultados no Anexo.

As amostras foram analisadas em duplicata e quando o desvio da média entre os resultados era igual ou superior a 20%, a amostra era reanalisada. Após reanálise, quando o CV se apresentava maior que 20%, a concentração de maior desvio era descartada para obtenção da contaminação média.

Foi necessária a reanálise de aproximadamente 17% das 207 amostras avaliadas, pois para estes casos, os desvios encontrados entre os resultados de uma mesma amostra se apresentaram superiores a 20%.

Os desvios entre as concentrações encontradas para uma mesma amostra embora dentro do limite de aceitação proposto neste estudo apresentaram variações independentemente da faixa de contaminação encontrada, ou da amostra ter sido reanalisada ou não. Esta variação pode ser consequência da característica de contaminação dos alimentos por micotoxinas, as últimas geralmente estão distribuídas de forma heterogênea no alimento (CAMPBELL, 1986). Desta forma, as etapas de amostragem e preparo da amostra tem papel tão importante na quantificação de fumonisinas quanto a etapa de análise.

No gráfico da FIGURA 27 são apresentadas as freqüências de contaminação por produto de milho das amostras analisadas. Para a determinação da freqüência as amostras contaminadas por traços de fumonisinas foram consideradas como amostras positivas. Os produtos que apresentaram maior freqüência de contaminação foram o fubá, creme de milho, flocos de milho, farinha de milho e snacks. Os snacks de milho apresentaram incidência de contaminação de 100% mas na maioria em concentrações inferiores ao limite de quantificação.

TABELA 13 – CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS ENCONTRADAS EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO CONSUMIDOS NO DISTRITO FEDERAL: INTERVALOS DE CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS, VALOR MÉDIO DAS CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS CONTAMINADAS (POSITIVAS), VALOR MÉDIO DAS CONCENTRAÇÕES, MEDIANA DAS CONCENTRAÇÕES.

Alimento	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)			FB ₂ (mg.kg ⁻¹)			FB ₁ + FB ₂ (mg.kg ⁻¹)			Nº de amostras positivas/ Nº de amostras analisadas
	Intervalo	Média ± s (positivas)	Média ± s (total)	Intervalo	Média ± s (positivas)	Média ± s (total)	Média ± s (positivas)	Média ± s (total)	Mediana (total)	
Cornflakes	nd – 0,78	0,35±0,27	0,10±0,21	nd - 0,12	0,26±0,34	0,05±0,17	0,41±0,31	0,12±0,25	0	12/21 (57%)
Creme de milho	0,59 – 2,55	1,42 ± 0,59	1,42 ± 0,59	0,25 – 1,08	0,61±0,23	0,61±0,23	2,04±0,79	2,04±0,79	1,82	11/11
Farinha de Milho	Traços - 1,95	0,46±0,46	0,46±0,50	nd - 0,15	0,22±0,11	0,19±0,09	0,68±0,53	0,66±0,53	0,43	21/21
Flocos de Milho	0,18 - 1,36	0,69±0,36	0,69±0,36	0,14 - 1,01	0,39±0,22	0,39±0,22	1,09±0,55	1,09±0,55	1,10	21/21
Fubá	0,15 - 4,73	1,23±0,78	1,23±0,78	0,11 - 1,43	0,43±0,27	0,43±0,27	1,68±1,01	1,68±1,01	1,37	62/62
Milho verde congelado	nd - 1,31	0,93±0,33	0,35±0,51	na	na	na	na	na	0	3/8 (37%)
Milho verde enlatado	nd - 1,44	0,97±0,50	0,19±0,44	na	na	na	na	na	0	3/15 (20%)
Milho verde in natura	nd	-	nd	na	na	na	na	na	0	0/6
Pipoca	nd - 1,23	0,48±0,28	0,40±0,32	nd - 0,85	0,34±0,19	0,26±0,22	0,81±0,46	0,67±0,53	0,62	21/23 (91%)
Snacks	nd - 0,33	0,20±0,06	0,09±0,11	nd - 0,22	0,19±0,04	0,04±0,08	0,31±0,16	0,14±0,19	0	20/20
Total	nd – 4,73	0,88±0,69	0,65±0,71	nd – 1,43	0,39±0,25	0,30±0,27	0,65±0,71	1,23±0,91	0,67	174/207 (84%)

NOTAS: traços = < 64 µg/kg, s = desvio padrão; nd = não detectado (< 32 µg/kg para FB₁ e < 64 µg/kg para FB₂); na = não analisado. *Incidência de pelo menos uma das fumonisinas (foram considerados traços de fumonisinas). Para obtenção dos valores médios, traços e valores não detectados foram considerados iguais a zero.

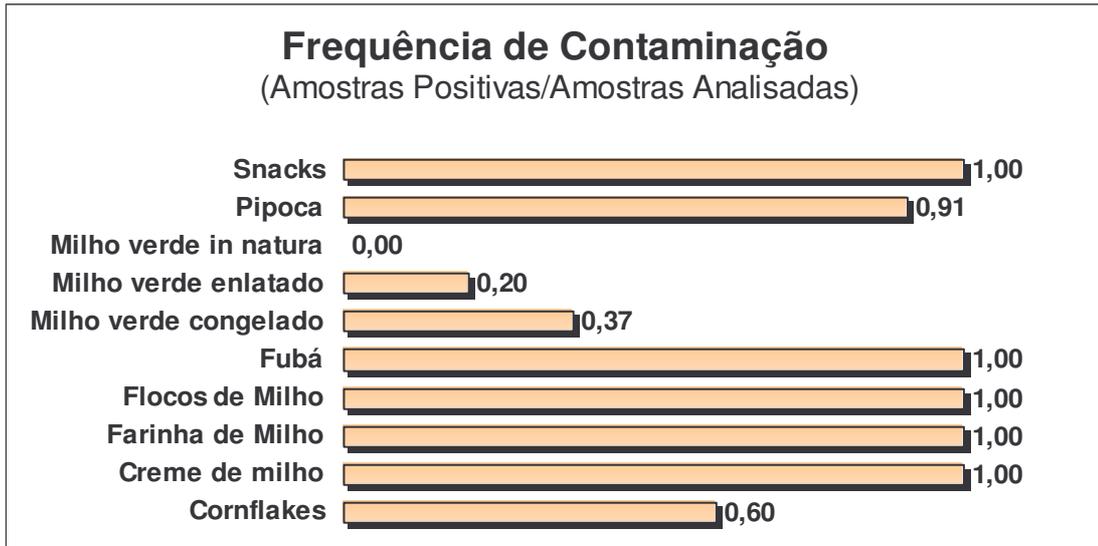


FIGURA 27 – FREQUÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO POR PRODUTO: AMOSTRAS CONTAMINADAS POR AMOSTRAS ANALISADAS.

Todas as amostras de farinha de milho, flocos de milho, creme de milho, e fubá analisadas estavam contaminadas com fumonisinas. Fubá e creme de milho, produtos obtidos diretamente da moagem e beneficiamento (retirada de gérmen e pericarpo) do milho maduro, apresentaram os maiores valores de concentração, chegando a $6,17 \text{ mg.kg}^{-1}$ em fubá (TABELA 14).

Nos gráficos das FIGURAS 28 e 29 é possível verificar a média das contaminações encontradas para cada produto de milho analisado e os respectivos valores máximos.

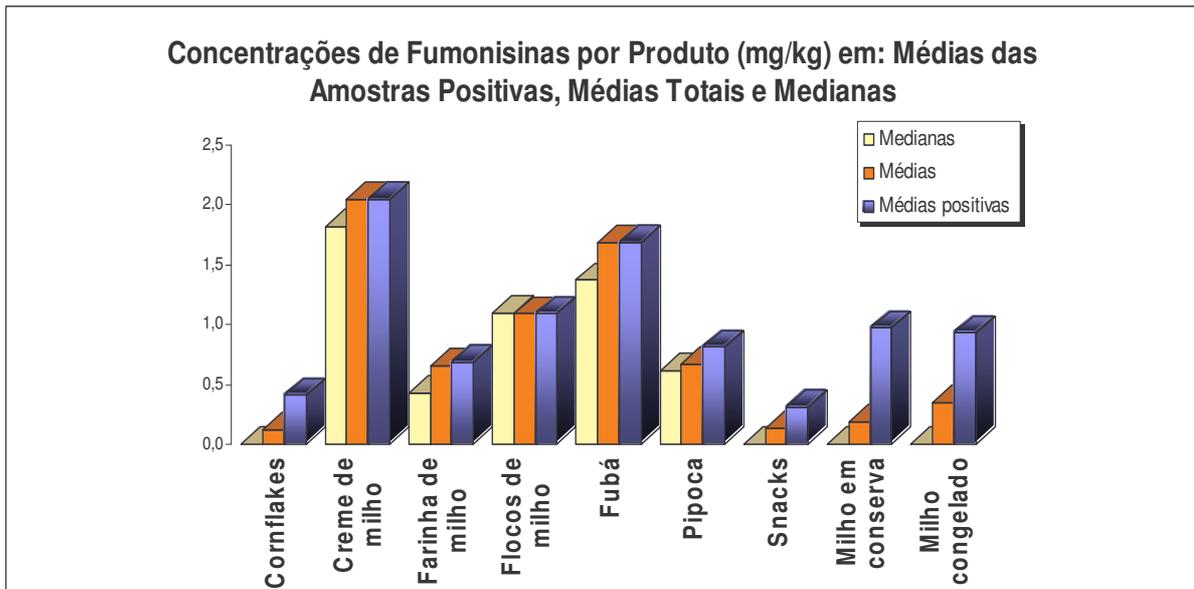


FIGURA 28 – MÉDIAS E MEDIANAS DAS CONCENTRAÇÕES DE FUMONISINAS NAS AMOSTRAS (mg.kg^{-1}).

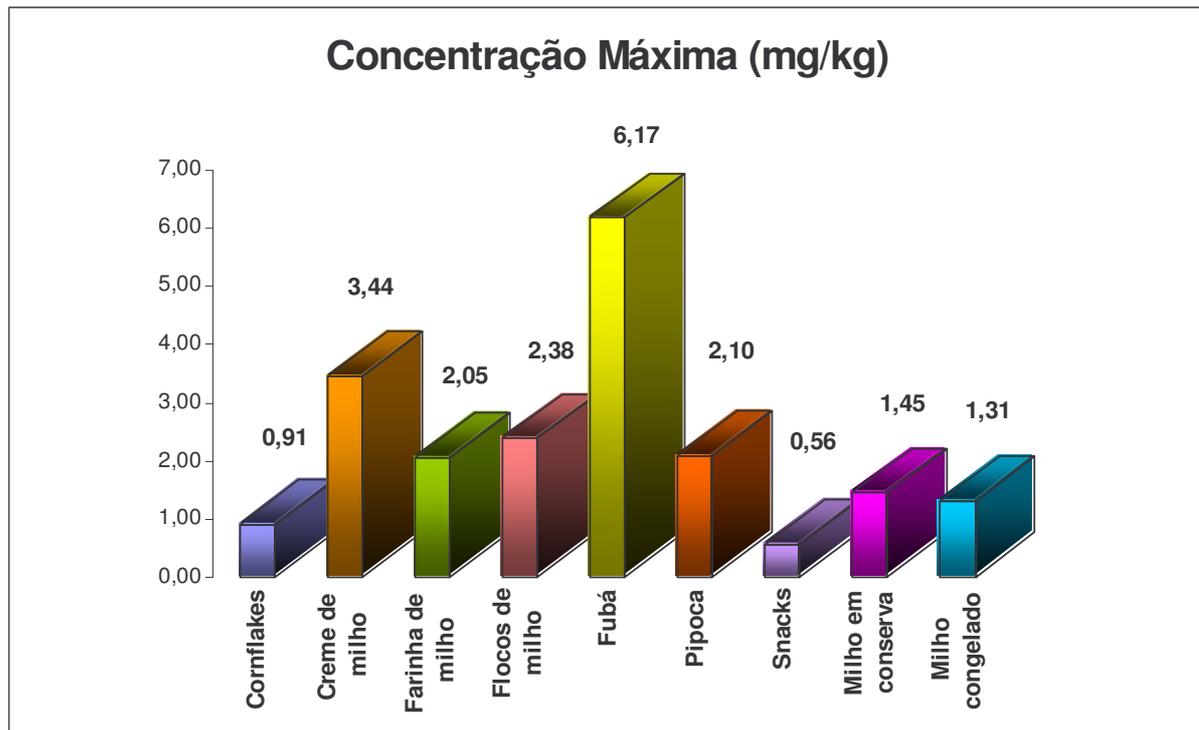


FIGURA 29 – GRÁFICO DAS CONCENTRAÇÕES MÁXIMAS DE FUMONISINAS ENCONTRADAS NOS PRODUTOS DE MILHO ANALISADOS (mg.kg^{-1}).

Os valores de contaminação encontrados são superiores aos encontrados em trabalhos de pesquisa realizados na África do Sul, no Canadá, no Peru (SYDENHAN et al, 1991), em países do leste e do sul da África (DOKO et al., 1996), na Suíça (PITTET et al., 1992); em Taiwan (TSENG & LIU, 1997), no Uruguai (PIÑERO et al., 1997) e na Itália (produtos orgânicos)(CIRILLO et al., 2003). Contaminações em faixas de valores mais próximos foram encontrados no Egito, nos EUA (SYDENHAN et al, 1991), em Zimbábue (DOKO et al., 1996), no Nepal (DEJARDINS et al., 2000) e na Itália (produtos convencionais)(CIRILLO et al., 2003), mas com valores máximos de contaminação de aproximadamente metade dos encontrados neste trabalho.

Ao compará-los com os valores encontrados em trabalhos realizados no Estado de São Paulo verifica-se que Machinski & Soares (2000) encontraram valores similares para fubá ($4,93 \text{ mg.kg}^{-1}$), farinha de milho ($1,79 \text{ mg.kg}^{-1}$), cornflakes ($0,66 \text{ mg.kg}^{-1}$), pipoca ($1,72 \text{ mg.kg}^{-1}$), e milho verde (não detectado) e inferiores para creme de milho ($1,46 \text{ mg.kg}^{-1}$), e milho enlatado ($0,08 \text{ mg.kg}^{-1}$). Enquanto que Bittencourt et al. (2004) que avaliaram somente fubá e creme de milho encontraram concentrações 3

vezes e 2,6 vezes superiores com máximo de $19,23 \text{ mg.kg}^{-1}$ e $8,96 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente.

As variações de contaminação em milho por fumonisinas entre países e entre diferentes regiões do Brasil podem ser justificadas por vários fatores, incluindo condições climáticas (temperatura média e índice pluviométrico), condições do solo (composição da microbiota e sua qualidade), práticas de plantio (como adubação e uso de monocultura), variedades de milho utilizadas e respectivas resistências a pragas (MAGAN et al., 2003; VINCELLI et al., 2002, HASAN, 1999, D'MELLO et al. 1998; MUNKVOLD et al., 1997). A comparação de contaminações entre produtos orgânicos e convencionais realizada na Itália seria um exemplo desta variação, quando os produtos convencionais apresentam maiores contaminações quando comparados com os produtos orgânicos (CIRILLO et al., 2003).

A faixa de contaminação encontrada em milho de pipoca, $<32 \text{ } \mu\text{g /kg}$ a $1,23 \text{ mg.kg}^{-1}$ para FB_1 e $<64 \text{ } \mu\text{g /kg}$ a $0,86 \text{ mg.kg}^{-1}$ para FB_2 foi similar às faixas encontradas em Taiwan (TSENG & LIU, 1997) com $< \text{LOQ}$ a $1,00 \text{ mg.kg}^{-1}$ para FB_1 e $< \text{LOQ}$ a $0,27 \text{ mg.kg}^{-1}$ para FB_2 e em Campinas-SP (MACHINSCKI & SOARES, 2000) com $< \text{LOQ}$ $\mu\text{g /kg}$ a $1,72 \text{ mg.kg}^{-1}$ para FB_1 . No Uruguai os valores encontrados para FB_1 foram inferiores a $0,19 \text{ mg.kg}^{-1}$. O milho para pipoca, apesar de ser um milho integral, pertence a uma variedade diferente do milho maduro utilizado para obtenção de farinha. Segundo produtor de semente de milho para pipoca (Cerealista Pantera Ltda), a planta de milho de pipoca, em comparação à de milho comum, apresenta maior porte, espigas menores e situadas numa posição mais alta, maior susceptibilidade ao quebramento e doenças e conseqüentemente menor produtividade de grãos.

A farinha de milho utilizada diretamente pelo consumidor, que normalmente se apresenta em forma de flocos grandes secos e desuniformes, chamada se "farinha de milho biju" e o produto chamado de flocos de milho são produtos obtidos da transformação do milho sem adição de ingredientes que passam por extrusão e cocção respectivamente. São produtos de consumo brasileiro e de difícil comparação com produtos encontrados em outros países devido às suas característica peculiares. A faixa de contaminação encontrada para flocos de milho ($0,34$ a $2,38 \text{ mg.kg}^{-1}$) é similar à apresentada no estudo brasileiro que avalia farinha de milho pré-cozida

(MACHINSCHI JR. & SOARES, 2000). O fato das concentrações encontradas serem inferiores às encontradas em fubá (0,27 a 6,17 mg.kg⁻¹) e creme de milho (0,84 a 3,44 mg.kg⁻¹) podem ser resultado dos processos de cocção e extrusão, que segundo Park et al. (2004) podem levar a interação das fumonisinas com proteínas e outras substâncias do alimento impedindo a sua quantificação pelo método quantitativo convencional aplicado neste estudo.

Produtos de milho como snacks e cornflakes normalmente apresentam contaminações inferiores a produtos de milho menos elaborados. Enquanto snacks e cornflakes apresentam faixas de contaminação em de valores menores que 32 µg/kg a 0,55 mg.kg⁻¹ e menores que 32 µg/kg a 0,91 mg.kg⁻¹, respectivamente, o fubá apresenta de 0,27 a 6,17 mg.kg⁻¹. São possíveis fatores diferentes para estas concentrações, a redução de concentração por diluição, ou bloqueio do seu grupo amina pela reação com açúcares redutores; e ainda a impossibilidade de quantificação das fumonisinas pelo método convencional quando as mesmas estão presentes em alimentos que passam por tratamentos térmicos. A diluição das fumonisinas no alimento pode ocorrer já que estes produtos contêm outros ingredientes na sua formulação, incluindo açúcar, amido e outros cereais. Com relação à presença de açúcares redutores existe a possibilidade dos últimos bloquearem o grupo amina das fumonisinas como fazem com as proteínas na Reação de Maillard (LU et al. 2002; LU et al., 1997; MURPHY et al (1996) apud LU et al., 2002), o que poderia dificultar a sua quantificação. Algumas marcas de cornflakes possuem em sua formulação açúcar e extrato de malte que são precursores de açúcares redutores em consequência de sua hidrólise durante a produção de alimentos submetidos à cocção.

O milho verde *in natura* ou processado apresentou uma baixa frequência de contaminação: 0% para milho verde, 20% para milho em conserva e 37% para milho congelado. No Brasil, o milho verde é, na maioria das vezes, o mesmo milho plantado para colheita de grão seco, ou pode ser decorrente da variedade chamada de milho doce que apresenta maiores teores de açúcares⁵. O milho verde, quando decorrente

⁵ Dados da EMBRAPA HORTALIÇAS 9(<http://www.cnph.embrapa.br/>), do Caderno especial do Jornal Correio Brasiliense – “Hortalças – Milho Verde” (<http://www2.correioweb.com.br/hotsites/alimentos/milhoverde/alimentos.htm>).

do milho comum, é colhido com alto teor de umidade, antes que os grãos comecem o processo de maturação fisiológica. Logo, é comum que produtos como milho verde *in natura*, milho enlatado ou milho congelado apresentem menores concentrações de fumonisinas que o milho maduro (MUNKVOLD et al., 1997). A faixa de contaminação encontrada para tais produtos ($< 32 \mu\text{g}/\text{kg}$ a $1,45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) foi superior às apresentadas nas referências da América do Sul (máximo de $1,45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) enquanto Piñero et al. (1997) encontraram um máximo de $0,11 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ no Uruguai, e Machinski & Soares (2000) encontraram $0,08 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ em Campinas-SP. Em Taiwan (TSENG & LIU, 1997) foi encontrado um máximo de $1,73 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Maiores contaminações poderiam ser esperadas nos produtos de milho seco oriundos de milho verde do presente estudo, caso estes fossem destinados à maturação, já que as fumonisinas começam a ser produzidas nos estágios anteriores a maturação fisiológica do grão (WARFIELD & GILCHRIST, 1999).

Nas TABELAS 14 e 15 os valores de contaminações encontradas no Distrito Federal são comparados aos encontrados em estudos brasileiros realizados em Campinas – SP (Machinski Jr. & Soares, 2000) e no Estado de São Paulo (Bittencourt et al., 2004) e com estudos realizados em Países de alta incidência de CE.

Na comparação entre estudos brasileiros pode-se sugerir que a contaminação encontrada no Distrito Federal é dependente da procedência (local e safra) do milho consumido.

As concentrações de fumonisinas encontradas em fubá no Estado de São Paulo são compatíveis com a contaminação de milho mofado ($3,4$ a $46,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) proveniente de região de alta incidência de CE em Transkei, África (THIEL et al (1992) apud BRAGAGNOLO & TOLEDO, 1994), levando-se em consideração que a contaminação do milho integral pode ser maior do que 3 vezes a contaminação de produtos de milho resultantes da moagem (SYDENHAM et al., 1994).

As contaminações encontradas no Distrito Federal são similares ou superiores às encontradas em produtos de milho nos estudos realizados em Países de alta incidência de CE.

TABELA 14 – COMPARAÇÃO ENTRE CONTAMINAÇÕES ENCONTRADAS NO DF COM CONTAMINAÇÕES DE OUTRAS LOCALIDADES BRASILEIRAS

<i>Amostras</i>	<i>Distrito Federal</i>		<i>Campinas - SP (Machinski Jr. & Soares, 2000)</i>			
	Incidência (nº positivas / total)	FB₁ (µg.g⁻¹) Intervalo de Concentração	Incidência (nº positivas / total)	FB₁ (µg.g⁻¹) Intervalo de Concentração		
Cornflakes	12/21	nd – 0,78	1/4	nd - 0.66		
Creme de milho	11/11	0,59 – 2,55	9/11	nd - 1.46		
Farinha de Milho	21/21	Traços - 1,95	4/6	nd - 1.79		
Fubá	62/62	0,15 - 4,73	9/9	0.56 - 4.93		
Milho enlatado	3/15	nd - 1,44	2/11	nd – 0,08		
Milho verde in natura	0/6	nd	0/7	nd		
Pipoca	21/23	nd - 1,23	4/9	nd-1.72		
<i>Amostras</i>	<i>Distrito Federal</i>		<i>São Paulo - SP (Bittencourt et al., 2004)</i>			
	Incidência (nº positivas / total)	Intervalo de Concentração		Incidência (nº positivas / total)	Intervalo de Concentração	
FB₁ (µg.g⁻¹)		FB₂ (µg.g⁻¹)	FB₁ (µg.g⁻¹)		FB₂ (µg.g⁻¹)	
Creme de milho	11/11	0,15 - 4,73	0,25 – 1,08	30/30	0,47 – 7,20	0,12 – 1,76
Fubá	62/62	0,59 – 2,55	0,11 - 1,43	30/30	1,08 – 15,29	0,23 – 3,94

NOTAS: No Distrito Federal: traços = < 64 µg/kg, nd = não detectado (< 32 µg/kg para FB₁ e < 64 µg/kg para FB₂). Incidência no DF: foram considerados traços de fumonisinas.

TABELA 15 – COMPARAÇÃO ENTRE CONTAMINAÇÕES ENCONTRADAS NO DF COM CONTAMINAÇÕES ENCONTRADAS EM PAÍSES COM CORRELAÇÃO POSITIVA ENTRE FUMONISINAS E CANCER DE ESÔFAGO

<i>Local (Referência)</i>	<i>Alimento</i>	<i>FB1(μg.g⁻¹)</i>		<i>FB2(μg.g⁻¹)</i>		<i>Incidência* (nº positivas / total)</i>
		<i>Intervalo</i>	<i>Média das Positivas</i>	<i>Intervalo</i>	<i>Média das Positivas</i>	
Distrito Federal	Fubá	0,15 - 4,73	1,23	0,11 - 1,43	0,43	62/62
Itália (<i>Cirillo et al., 2003</i>)	Pipoca, farinha, cuzcuz, polenta, biscoitos e matinais (produtos convencionais)	0,02 - 2,16	0,34	0,01 – 0,40	0,02	8/27
País do leste ou do sul da África (<i>Doko et al., 1996</i>)	Fubá	0,05 – 1,91	0,62	nd – 0,62	0,38	4/4
África do Sul (<i>Sydenham et al., 1991</i>)	Fubá	nd - 0,47	0,13	nd - 0,13	0,08	46/52
EUA (<i>Sydenham et al., 1991</i>)	Fubá	nd – 2,79	1,04	nd – 0,92	0,29	15/16

4.3 INGESTÃO DE FUMONISINAS PELO CONSUMO DE MILHO E OS RISCOS PARA A SAÚDE

Ingestão diária de fumonisinas FB₁ e FB₂ pelo consumo de produtos de milho pode ser calculada pela fórmula “Ingestão = $\sum [C \text{ (mg.kg}^{-1}) \times A \text{ (kg/dia)}/ \text{peso corpóreo}$ ”, onde **C** é a concentração de micotoxina no alimento e **A** o consumo do alimento (WHO, 1997). Os valores são apresentados nas TABELAS 15 e 16 com base nas contaminações encontradas no presente estudo e no consumo de alimentos destes produtos pela população do Distrito Federal e do Centro – Oeste (IBGE, 2004a).

A Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF (IBGE, 2004a), dos quais foram extraídos dados de consumo fornece informações sobre estruturas de consumo, dos gastos e dos rendimentos das famílias. Reúne informações quanto à aquisição alimentar domiciliar de produtos de milho de maneira a permitir o cálculo de ingestão de fumonisinas pelo consumo de produtos de milho no Distrito Federal e região centro-oeste. Estes dados são resultado de pesquisa com registro diário, durante sete dias consecutivos, da descrição detalhada de cada produto adquirido, da quantidade, da unidade de medida e respectivo peso ou volume, quando pertinente, de acordo com o local de compra e da forma de obtenção do produto. Fica claro que esta pesquisa não inclui o consumo de produtos alimentícios não adquiridos, ou seja, produzidos ou cultivados pelo consumidor. Isto atribuiria uma grande margem de erro se o Distrito Federal se destacasse pelo cultivo de produtos de milho. No Brasil as maiores regiões produtoras de milho são o Sul com 24.127.162 toneladas (49,9%), Sudeste com 10.213.365 toneladas (21,1%) e o Centro oeste com 10.076.802 toneladas (20,8%). O Distrito Federal contribui para 1% da produção total de milho do Centro Oeste enquanto Santa Catarina contribui com 17,8 % da produção do Sul e 8,9 % do País e São Paulo com 46,3% do Sudeste e 9,8% do País (IBGE, 2004b). A seguir são apresentados os consumos dos produtos de milho no Distrito Federal com base na aquisição alimentar domiciliar *per capita* fornecida pelo IBGE (2004a).

TABELA 16 – CONSUMO DE PRODUTOS A BASE DE MILHO (IBGE, 2004).

Alimento	Consumo (kg/ano)
Cornflakes + Snacks	0,027
Creme de Milho	0,034
Farinha de Milho	0,015
Flocos de Milho	0,277
Fubá	1,119
Milho para Pipoca	0,244
Milho Verde	0,671

FONTES: IBGE, 2004a. Os produtos cornflakes e snacks foram agrupados na classificação de “Outros” em “Panificados”. Milho verde, milho em conserva e milho congelado foram agrupados e classificados como “Milho verde em conserva + Milho verde em espiga” em “Cereais”. O milho para pipoca foi classificado como “Milho em grão” em “Cereais”. A farinha de milho como “Outras” em “Farinhas”.

O cálculo da ingestão foi feito a partir da média, da mediana, do percentil 97,5 e do valor máximo das concentrações de fumonisinas encontradas (valores totais: soma de FB₁ e FB₂) considerando um peso corpóreo médio de 60 kg. Os valores abaixo do limite de quantificação (64 µg/kg) do método empregado foram considerados matematicamente como zero.

A provável ingestão diária de fumonisinas pelos produtos avaliados para a população do Distrito Federal e para a população da região Centro-Oeste apresentaram valores máximos de respectivamente 0,42 e 0,49 µg/kg de peso corpóreo ao dia. Segundo a OMS, a ingestão diária de até 2 µg. kg⁻¹ de peso corpóreo de fumonisinas ao dia (FAO/WHO, 2002) não deve significar um risco para a saúde humana. Os resultados mostrados na TABELA 17 indicam que a ingestão de fumonisinas a propósito do consumo de produtos de milho no Distrito Federal representa no máximo 20% da ingestão considerada segura, mesmo se houvesse o consumo diário destes alimentos contaminados nas maiores concentrações encontradas.

No Distrito Federal, a maioria dos produtos de milho são procedentes de outras regiões do País como evidenciado na rotulagem dos produtos avaliados. Assim os valores de contaminação podem ser variáveis em função da região de cultivo e safra de procedência do milho. Tal fato pode ser evidenciado pelos diferentes valores de

contaminação encontrados para produtos de milho no Estado de São Paulo. Enquanto Machinski Jr. & Soares (2000) encontraram contaminações em fubá em concentrações similares as encontradas neste estudo, Bittencourt et al. (2005) encontraram valores de até 3 vezes mais.

Neste estudo o milho de pipoca foi considerado como pertencente ao grupo de milho integral. De acordo com o estudo de Machinski & Soares (2000) realizado com produtos de milho no Estado de São Paulo a contaminação do milho de pipoca (máximo de $1,72 \text{ mg.kg}^{-1}$ de FB_1) chega a ser três vezes menor que a contaminação do fubá (máximo de $4,93 \text{ mg.kg}^{-1}$ de FB_1) como relação avaliada neste trabalho com $2,09 \text{ mg.kg}^{-1}$ para $6,17 \text{ mg.kg}^{-1}$ de fumonisinas $\text{FB}_1 + \text{FB}_2$. O fubá obtido da moagem do milho depois de retirada do gérmen e pericarpo deve possuir contaminação bem menor que três vezes a contaminação original do milho integral (SYDENHAM et al., 1994). A partir destas considerações pode-se prever um aumento nos valores de provável ingestão diária encontrados em função da inclusão das contaminações de milho integral comum na lista de produtos avaliados.

TABELA 17 – INGESTÃO DIÁRIA DE FUMONISINAS NO DISTRITO FEDERAL COM BASE NA CONTAMINAÇÃO ENCONTRADA EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO.

Alimento	Consumo (kg/ano)	Ingestão Diária por Produto no Distrito Federal (µg/kg de peso corpóreo ao dia)			
		Base de Cálculo			
		Contaminação Média	Mediana da Contaminação	Percentil 97,5 da Contaminação	Contaminação Máxima
Cornflakes + Snacks	0,027	0,00016	0,00000	0,00076	0,00112
Creme de Milho	0,034	0,00317	0,00283	0,00528	0,00534
Farinha de Milho	0,015	0,00045	0,00030	0,00134	0,00140
Flocos de Milho	0,277	0,01381	0,01398	0,02668	0,03010
Fubá	1,119	0,08589	0,06995	0,17286	0,31547
Milho para Pipoca	0,244	0,00748	0,00692	0,02071	0,02336
Milho Verde	0,671	0,00604	0,00000	0,04149	0,04440
Ingestão Diária Total (µg/kg de peso corpóreo ao dia)		0,12	0,09	0,27	0,42

* Os quatro valores de **Ingestão Diária Total e de** Ingestão Diária por Produto são correspondentes a cálculos de ingestão realizados com valor médio, mediana, percentil 97,5 e máximo de contaminação encontrados. Considerou-se peso corpóreo de 60 kg. No corpo da tabela são apresentados os valores de ingestão diária por produto. Na última linha da tabela são apresentados os valores de ingestão diária total (somatória das contribuições de cada produto avaliado).

TABELA 18 – INGESTÃO DIÁRIA DE FUMONISINAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE COM BASE NA CONTAMINAÇÃO ENCONTRADA EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO.

Alimento	Consumo (kg/ano)	Ingestão Diária por Produto no Distrito Federal (µg/kg de peso corpóreo ao dia)			
		Base de Cálculo			
		Contaminação Média	Mediana da Contaminação	Percentil 97,5 da Contaminação	Contaminação Máxima
Cornflakes + Snacks	0,005	0,00003	0,00000	0,00014	0,00021
Creme de Milho	0,013	0,00121	0,00108	0,00202	0,00204
Farinha de Milho	0,04	0,00119	0,00079	0,00356	0,00374
Flocos de Milho	0,085	0,00424	0,00429	0,00819	0,00924
Fubá	0,896	0,06878	0,05601	0,13841	0,25260
Milho para Pipoca	1,686	0,05166	0,04781	0,14312	0,16144
Milho Verde	0,957	0,00861	0,00000	0,05917	0,06332
Ingestão Diária Total (µg/kg de peso corpóreo ao dia)		0,14	0,11	0,35	0,49

* Os quatro valores de **Ingestão Diária Total e de** Ingestão Diária por Produto são correspondentes a cálculos de ingestão realizados com valor médio, mediana, percentil 97,5 e máximo de contaminação encontrados. Considerou-se peso corpóreo de 60 kg. No corpo da tabela são apresentados os valores de ingestão diária por produto. Na última linha da tabela são apresentados os valores de ingestão diária total (somatória das contribuições de cada produto avaliado).

Avaliando as probabilidades de ingestão diária de fumonisinas para a população infantil do Distrito Federal (TABELA 19) as mesmas não ultrapassaram o valor recomendado pela OMS.

Crianças com faixa de idade entre 13 e 15 anos apresentam ingestão diária com valores muito próximos dos encontrados para a população total (para peso corpóreo de 60 kg), e representando no máximo 20% da ingestão recomendada pela OMS.

Os valores mais prováveis para ingestão diária da população infantil do Distrito Federal representam de 6 a 24% da ingestão diária tolerável.

A faixas de idade de 1 a 3, 3 a 5, 6 a 8 e de 9 a 12 anos apresentaram provável ingestão diária de no máximo 1,94, 1,51, 1,05 e 0,69 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo, correspondendo a 97%, 75%, 52% e 34% da ingestão recomendada pela OMS. Embora o valor mais provável de exposição das crianças a fumonisinas (ingestão diária) seja obtido a partir da contaminação média ou da mediana da contaminação é importante evidenciar que o valor encontrado para faixa de 1 a 3 anos de idade a partir da contaminação máxima representa 97% da ingestão recomendada pela OMS. Assim sendo, a faixa de idade de 1 a 3 anos seria a mais exposta ao risco de ingestão de fumonisinas.

TABELA 19 – INGESTÃO DIÁRIA INFANTIL DE FUMONISINAS NO DISTRITO FEDERAL COM BASE NA CONTAMINAÇÃO ENCONTRADA EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO.

Ingestão Diária Infantil por Faixa de Idade no Distrito Federal ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo ao dia)				
Faixa de Idade (Peso Corpóreo Médio)	Base de Cálculo			
	Contaminação Média	Mediana da Contaminação	Percentil 97,5 da Contaminação	Contaminação Máxima
1 a 3 anos (13 kg)	0,54	0,43	1,24	1,94
3 a 5 anos (16,7 kg)	0,42	0,34	0,97	1,51
6 a 8 anos (24,1 kg)	0,29	0,23	0,67	1,05
9 a 12 anos (36,4 kg)	0,19	0,15	0,44	0,69
13 a 15 anos (51,6 kg)	0,14	0,11	0,31	0,49

*Os quatro valores de ingestão diária por faixa de idade são correspondentes a cálculos realizados com valor médio, mediana, percentil 97,5% e máximo de contaminação encontrados, respectivamente. Considerou-se peso corpóreo médio de acordo com as faixas de idade. Utilizou-se a tabela de peso por idade do National Center for Health Statistic (<http://www.cdc.gov/growthcharts>).

Ao avaliar a participação dos produtos analisados na ingestão de fumonisinas calculada a partir das maiores concentrações encontradas (TABELA 17), observou-se que o fubá seria responsável por 74% do valor encontrado, seguido por 9% do milho verde, 7% dos flocos de milho, 4,6% do milho de pipoca e 2,3% do creme de milho. O fubá é o produto que mais contribui para o valor de ingestão diária calculado. Sendo assim, o fubá seria o produto de maior importância para o cálculo da ingestão diária no Distrito Federal dentre os produtos avaliados.

Na comparação de ingestão provável entre classes de rendimento monetário que compõem a população do centro-oeste (TABELA 20), observa-se que o segmento da população mais exposto as fumonisinas é o correspondente a faixa de renda de R\$ 400,00 a R\$600,00 mensais. De acordo com o teste estatístico de Dunn o comportamento de ingestão provável apresentado por cada segmento de rendimento monetário é diferente com $\alpha = 0,01$ (probabilidade do erro tipo I). Desta forma evidencia-se que o hábito alimentar para cada classe atribui diferentes possibilidades de ingestão provável (TABELA 21). As classes de maior poder aquisitivo tendem a consumir produtos mais elaborados que apresentariam menores contaminações de fumonisinas, além do consumo dos produtos de milho da classe de maior renda ser três vezes menor que a soma do consumo da classe com rendas menores. Tal fato pode indicar que a faixa da população de menor renda da região Centro-Oeste como a mais exposta as fumonisinas pelo consumo de produtos de milho quando comparadas com faixas de maior renda devido ao hábito de consumo alimentar de acordo com a renda familiar.

Na TABELA 22 são comparados os valores de ingestão diária deste estudo com dois estudos brasileiros, assim como as respectivas incidências de câncer de esôfago por região avaliada de acordo com a previsão do INCA para 2005.

TABELA 20 – INGESTÃO DIÁRIA DE FUMONISINAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE POR RENDA FAMILIAR MENSAL COM BASE NA CONTAMINAÇÃO ENCONTRADA EM DIFERENTES PRODUTOS A BASE DE MILHO.

Ingestão Diária por Renda Familiar Mensal - Centro Oeste (µg/kg de peso corpóreo ao dia)				
Faixa de Rendimento	Base de Cálculo			
	Contaminação Média	Mediana da Contaminação	Percentil 97,5 da Contaminação	Contaminação Máxima
de até R\$ 400,00 (quatrocentos reais)	0,15	0,12	0,39	0,55
de R\$400,00 (quatrocentos reais) até R\$ 600,00 (seiscentos reais)	0,19	0,16	0,51	0,66
de R\$600,00 (seiscentos reais) até R\$ 1.000,00 (mil reais)	0,13	0,10	0,36	0,49
de R\$1.000,00 (mil reais) até R\$ 1.600,00 (mil e seiscentos reais)	0,15	0,12	0,38	0,55
de R\$1.600,00 (mil e seiscentos reais) até R\$ 3.000,00 (três mil reais)	0,11	0,09	0,27	0,40
maior que R\$ 3.000,00 (três mil reais)	0,08	0,06	0,19	0,28

* Os quatro valores de **Ingestão Diária para cada faixa de renda** são correspondentes a cálculos de ingestão realizados com valor médio, mediana, percentil 97,5 e máximo de contaminação encontrados. Considerou-se peso corpóreo de 60 kg.

TABELA 21 –CONSUMO PER CAPITA DE PRODUTOS A BASE DE MILHO NA REGIÃO CENTRO OESTE POR RENDIMENTO FAMILIAR (IBGE, 2004a).

Consumo per capita de produtos a base de milho por rendimento familiar monetário e não-monetário mensal (kg/ano)						
Alimento	Faixa de Rendimento					
	de até R\$ 400,00	de R\$400,00 até R\$ 600,00	de R\$600,00 até R\$ 1.000,00	de R\$1.000,00 até R\$ 1.600,00	de R\$1.600,00 até R\$ 3.000,00	maior que R\$ 3.000,00
Cornflakes + Snacks	0,008	0	0	0,006	0,003	0,019
Creme de Milho	0,027	0,015	0,013	0,006	0,003	0,018
Farinha de Milho	0,023	0,015	0,044	0,063	0,058	0,026
Flocos de Milho	0,039	0,029	0,046	0,053	0,094	0,289
Fubá	1,104	0,837	0,805	1,16	0,897	0,571
Milho para Pipoca	1,771	3,796	1,631	1,608	0,845	0,435
Milho Verde	0,903	0,853	1,434	0,878	0,797	0,581

TABELA 22 – INGESTÃO DIÁRIA DE FUMONISINAS E INCIDÊNCIA DE CÂNCER DE ESÔFAGO NO BRASIL

Local	Ingestão Diária (µg/kg de peso corpóreo ao dia)	Incidência de CE (nº de casos /100.000 indivíduos)
Distrito Federal	0,1	4
Santa Catarina (VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003)	> 1,6	8,5
São Paulo (BITTENCOURT et al., 2005)	2,9 (rural) 0,9 (urbana)	6,5

Em Santa Catarina foi avaliado consumo de milho comum integral maduro proveniente da safra de 2000 e no Estado de São Paulo o consumo de fubá para o cálculo da ingestão diária. Os valores de incidência de CE foram obtidos pela média de incidência em homens e mulheres de acordo com a previsão do INCA para 2005 (INCA, 2004).

Em Santa Catarina a relação de incidência de câncer e consumo seria conseqüência de um alto consumo de milho, cerca de 25% da produção, pelos próprios produtores da região. As contaminações encontradas no milho apresentaram contaminação similar às maiores concentrações encontradas em regiões do mundo com alto índice de CE (VAN DER WESTHUIZEN et al. 2003).

No Estado de São Paulo as previsões foram calculadas com base no consumo de fubá em área rurais e urbanas conforme IBGE para o ano de 1977. As contaminações encontradas para fubá e creme de milho variavam de 1,08 a 15,29 mg.kg⁻¹ e 0,47 a 7,20 mg.kg⁻¹, respectivamente. A concentração média das amostras positivas de fubá foi de 5,17 ± 3,68, esta três vezes maior que a encontrada para as amostras de fubá do Distrito Federal.

Esta comparação de estudos sugere que a população rural seria a mais exposta ao risco de ingestão de fumonisinas devido ao consumo de milho comum integral maduro em Santa Catarina e ao maior consumo de produtos de milho no Estado de São Paulo.

Não foram mencionados nestes estudos outros fatores que possam estar relacionados à incidência de câncer de esôfago além das fumonisinas, mas as contaminações encontradas em milho e em produtos de milho indicam coerência na correlação estabelecida entre concentrações de fumonisinas e a incidência de CE no Brasil.

5 CONCLUSÕES

- A metodologia de análise de fumonisinas foi validada para 10 produtos a base de milho.
- Fubá, creme de milho, flocos de milho e farinha de milho foram os produtos mais contaminados e com maior frequência de contaminação.
- As contaminações encontradas neste estudo foram similares às encontradas em regiões de alta incidência de câncer de esôfago.
- Alimentos que sofrem tratamento de cocção, extrusão ou torrefação no processo de obtenção do produto como farinha de milho, flocos de milho, snacks e cornflakes e são analisados pela metodologia empregada podem apresentar valores de contaminação inferiores aos valores reais.
- O milho maduro integral apresenta maiores concentrações de fumonisinas quando comparado aos seus produtos nos quais são extraídos pericarpo e gérmen.
- O Brasil possui condições climáticas que favorecem o desenvolvimento de *Fusarium* e conseqüentemente a produção de fumonisinas, além de ser um grande consumidor de milho.
- Os consumidores do Distrito Federal podem estar sujeitos ao consumo de diferentes concentrações de fumonisinas devido às diferentes procedências dos produtos de milho comercializados na região.
- Dos produtos avaliados o fubá apresenta a maior contribuição para a ingestão diária de fumonisinas no Distrito Federal.

- Os prováveis valores de ingestão de fumonisinas encontrados para o Distrito Federal com relação aos produtos de milho avaliados neste estudo representaram até 20 % da ingestão diária tolerável. Para crianças entre 1 e 5 anos estes valores apresentaram até 85% da ingestão diária tolerável.

RECOMENDAÇÕES

- Este estudo sugere a necessidade de uma avaliação permanente pela Vigilância Sanitária no Distrito Federal da qualidade dos produtos de milho consumidos pela população, principalmente do fubá, quanto às concentrações de fumonisinas.
- Verificar em abrangência nacional o risco a que a população rural está sujeita pelo consumo de milho comum integral maduro produzido para autoconsumo.
- Que a ANVISA deva considerar o estabelecimento no Brasil de limites máximos toleráveis de fumonisinas para milho e para produtos a base de milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H. K. et al. Aflatoxin and Fumonisin Contamination of Commercial Corn (*Zea mays*) Hybrids in Mississippi. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 50: 5246-5254, 2002.
- ABBAS, H. K. et al. The Presence and Phytotoxicity of Fumonisin and AAL-Toxin in *Alternaria alternata*. **Toxicon**, Vol. 34: 133-136, 1996.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) **Rótulos de alimentos – Modelos de Rótulos**. Fonte: Virtual Nutri e USDA, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/rotulos/index.htm> Acessado em: 28/02/2005.
- ALMEIDA, A. P. et al. Mycoflora and Fumonisin Contamination in Brazilian Corn from Sowing to Harvest. **J. Agric. Food Chem** (50): 3877-3882, 2002
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos** - Teoria e Prática. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1995. 335 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS MOAGEIRAS DE MILHO (ABIMILHO). Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/>> Acesso em : 08/09/2003.
- BENNETT, G. A. et al. Influence of Processing on Fusarium Micotoxins in Contaminated Grains. **Food Technology**, May: 235-238, 1996.
- BENNETT, G. A. et al. Liquid Chromatographic Method for Analysis of the Naphthalene Dicarboxaldehyde Derivative of Fumonisin. **Journal of AOAC International**, Vol. 77 n°2: 501-506, 1994.
- BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure Elucidation of the Fumonisin, Mycotoxin from *Fusarium moniliforme*. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**:743-745, 1988.
- BITTENCOURT, A. B. F. et al. Mycotoxin Occurrence in Corn Meal and Flour Traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, Vol. 16: 117-120, 2005.
- BOLGAR, M. et al. **Fumonisin**. JECFA; *International Programme on Chemical Safety – IPCS*. 2001.
- BRAGAGNOLO, N. and TOLEDO, M. C. F. Fumonisin, um Novo Grupo de Micotoxinas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 28(2):77-182, jul./dez. 1994.
- BRANHAM, B. E. et al. Isolation and Characterization of a New Fumonisin from Liquid Cultures of *Fusarium moliniforme*. **Journal of Natural Products**, 56(9): 1630 – 1633, 1993.

CALDAS, E. D. et al. Biosynthetic Studies of Fumonisin B₁ and AAL Toxins. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 46 nº11: 4734-4743, 1998.

CAMARGOS, S. M. et al. Fumonisin in Corn Cultivars in The State of São Paulo. **Brasilian Journal of Microbiology**, 31: 226-229, 2000.

CAMPBELL, A. D. et al. Sampling, sample preparation, and sampling plants for foodstuffs for mycotoxinanalysis. **Pure & Appl. Chem.** Vol. 58(2): 305-314, 1986.

CASS; Q. B. and DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC – Fundamentos, Estratégias e Validação.** São Carlos, SP: EdUFSCar, 2001.77p.

CASTELLÁ, G. et al; Surveillance of Fumonisin in Maize-Based Feeds and Cereals from Spain. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 47: 4707-4710, 1999.

CAWOOD, M. E. et al. Isolation of the Fumonisin Mycotoxins: A Quantitative Approach. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 39: 1958-1962, 1991.

Cerealista Pantera LTDA. Disponível em:
<http://www.pantera.com.br/html/produto4a.htm> Acesso em: 11/03/2005.

CHO, Y. et al. Comparative Study of Naphthalene-2,3-carboxaldehyde and o-Phthaldehyde Fluorofenic Reagents for Chromatographic Detection of Sphingoid Bases. **Journal of Chromatography A**, 977: 69-76, 2002.

CIOLA; R. **Fundamentos de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho - HPLC.** São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 1998. 179p.

CIRILLO, T. et al. Evaluation of Conventional and Organic Italian Foodstuffs for Dextrovalenol and Fumonisin B₁ and B₂. **J. Agric. Food Chem.** 51: 8128 – 8131, 2003.

CONCHA-HERRERA, V. et al. Enhancement of Retention Predictions in Reversed-phase Liquid Chromatography Using Reference Compounds. **Analytica Chimica Acta**, 518: 191–197, 2004.

CONN, E. E. and STUMPF, P. K. **Introdução à Bioquímica.** Tradução por Lélia Mennucci e outros. São Paulo: Edgar Blücher, 1980. p.36. Tradução de: Outlines of Biochemistry, 1976.

D'MELLO, J. P. F. et al. Pesticide Use and Mycotoxin Production in *Fusarium* and *Aspergillus* Phytopathogens. **European Journal of Plant Pathology**, 104: 741 – 751, 1998.

DE LA CAMPA, R. et al. Fumonisin in Tortillas Produced in Small-Scale Facilities and Effect of Traditional Masa Production Methods on This Micotoxin. **J. Agric. Food Chem.** 52: 4432 – 4437, 2004.

DEJARDINS, A. E. et al. Occurrence of *Fusarium* Species and Mycotoxins in Nepalese Maize and Wheat and the Effect of Traditional Processing Methods on Mycotoxin Levels. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 48: 1377-1383, 2000.

DELAUNAY, N. et al., Immunoaffinity Solid-phase Extraction for the Trace-analysis of Low-molecular-mass Analytes in Complex Sample Matrices **Journal of Chromatography B**, 745: 15–37, 2000.

DILKIN, P. et al. Production of Fumonisin by Strains of *Fusarium moliniforme* According to Temperature, Moisture and Growth Period. **Brasilian Journal of Microbiology**,. 33: 111 – 118, 2002.

DOKO, M. B. et al. Natural Co-occurrence of Fumonisin and Zearalenone in Cereals and Cereal-Based Foods from Eastern and Southern Africa. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 44: 3240-3243, 1996.

DOKO, M. B. et al. Incidence and Levels of Fumonisin Contamination in Maize Genotypes Grown in Europe and Africa. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 43: 429-434, 1995.

DOMBRINK-KURTZMAN, M. A. and DVORACK, T. J. Fumonisin Content in Masa and Tortillas from Mexico. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 47 n^o2: 622-627, 1999.

DOOHAAN, F. M. et al. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. **European Journal of Plant Pathology**, 109: 755 – 768, 2003.

DORRESTEIJN, R.C. et al. Determination of amino acids using o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization - Effect of reaction conditions. **Journal of Chromatography A**, 724: 159-167, 1996.

DUNCAN, E. D. et al. Improved Fluorometric and Chromatographic Methods for the Quantification of Fumonisin B₁, B₂ and B₃. **Journal of Chromatographic A.**, 815, p.41-47, 1998.

EHRlich, V. et al. Fumonisin B₁ is Genotoxic in Human Derived Hepatoma (HepG2) Cells. **Mutagenesis**. Vol. 17(3): 257 – 260, 2002.

ETCHEVERRY, M. et al. In Vitro Control of Growth and Fumonisin Production by *Fusarium Verticillioides* and *F. Proliferatum* Using Antioxidants Under Different Water Availability and Temperature Regimes. **Journal of Applied Microbiology**,. 92: 624 – 632, 2002.

FANDOCHAN, P. et al. Natural Occurrence of *Fusarium* and Subsequent Fumonisin Contamination in Preharvest and Stored Maize in Benin, West Africa. **International Journal of Food Microbiology**, in press, 2004.

FAO/OMS/PNUMA. **Micotoxinas de Interés Creciente: Fumonisin**. TERCERA CONFERENCIA INTERNACIONAL MIXTA FAO/OMS/PNUMA SOBRE

MICOTOXINAS; mar. 1999. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/myco5a.pdf>> Acesso em: 09/07/2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) / WHO. **Evaluation Of Certain Mycotoxins**. Executive Board EB110/6, 110th Session, abr. 2002. Disponível em: <http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB110/eeb1106.pdf> Acesso em: 01 ago. 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Background Paper In Support Of Fumonisin Levels In Corn And Corn Products Intended For Human Consumption**. Boletim Técnico nº 36, U. S. nov. 2001_b. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumonbg3.html>> Acesso em: 13 mar. 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Background Paper In Support Of Fumonisin Levels In Animal Feed**. U. S., nov. 2001_c. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumonbg4.html>> Acesso em: 13 mar. 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance For Industry - Fumonisin Levels In Human Foods And Animal Feeds**. U. S., nov. 2001_a. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumongu2.html>> Acesso em: 31 jul. 2004.

GAMANYA, R. and SIBANDA, L.; Survey of *Fusarium moliniforme* (*F. verticillioides*) and Production of Fumonisin B₁ in Cereal Grains and Oilseeds in Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**. 71: 145-149. 2001.

GAVA, A. J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Nobel, 1979. cap.2, p. 57-70.

GELDERBLOM, W. C. A. et al. Fumonisins - Novel Mycotoxins with Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 54(7): 1806-1811, 1988.

GIROLAMO, A. D. et al. Comparison of Different Extraction and Clean-up Procedures for the Determination of Fumonisins in Maize-based Food Products. **Food Additives and Contaminants**, Vol. 18 nº1: 59-67, 2001.

GONZÁLEZ, H. H. L. et al. Mycoflora of Freshly Harvested Flint Corn from Northwestern Provinces in Argentina. **Mycopathologia**, Vol. 155: 207-211, 2001.

GROVES, F. D. et al. *Fusarium* Mycotoxins in Corn and Corn Products in High-Risk Area for Gastric Cancer in Shandong Province, China. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 82(3): 657-662, 1999.

HASAN, H. A. H. Phytotoxicity of Pathogenic Fungi and their Mycotoxins to Cereal Seedling Viability. **Mycopathologia**, Vol. 148: 149-155, 1999.

HENDRICH, S. et al. Toxicity of *Fusarium proliferatum* – Fermented Nixtamalized Corn-Based Diets Fed to Rats: Effect of Nutritional Status. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 41: 1649-1654, 1993.

HOPMANS, E. C. and MURPHY, P. A. Detection of Fumonisin B₁, B₂, B₃ and Hydrolyzed Fumonisin B₁ in Corn-Containing Foods. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 41: 1655-1658, 1993.

HUMPF, H. et al. Acylation of Naturally Occurring and Synthetic 1-Deoxysphinganine by Ceramide Synthase. **The Journal Of Biological Chemistry.** Vol. 273 (30): 19060–19064, 1998.

HUSSEIN, H. M. et al; Occurrence and Distribution of *Fusarium* Species in Maize Fields in New Zealand. **Mycopathologia**, Vol. 156: 25-30, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004a.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção Agrícola Municipal – Culturas Temporárias e Permanentes, 2003**. Rio de Janeiro: IBGE, vol.30, 2004b.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) - **Incidência de Câncer no Brasil (Estimativa 2005)**. Rio de Janeiro: INCA, 2004. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/index.asp?link=mapa.asp&ID=7>> Acesso: 22/02/2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans - Toxins Derived From Fusarium Moniliforme: Fumonisin B₁ And B₂ And Fusarin C (Group 2B)**. Vol.: 56 p.445, 1993. Disponível em: <<http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol56/11-monil.htm> > Acessado em: 13/02/2005.

JACKSON, L. S. et al. Effect of Thermal Processing on the Stability of Fumonisin B₂ in an Aqueous System. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 44: 1984-1987, 1996b.

JACKSON, L. S. et al. Effect of Time, Temperature, and pH on the Stability of Fumonisin B₁ in an Aqueous Model System. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 44: 906-912, 1996a.

JACKSON, L. S. et al; Effects of Baking and Frying on The Fumonisin B₁ Content of Corn-Based Foods. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 45: 4800-4805, 1997.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de los Alimentos**. Tradução por Dr. Manuel Ramis Vergés. Zaragoza (Espanha): Editorial Acríbia, 1992. 787p. Tradução de: Modern Food Microbiology, fourth edition. p. 30-35, p. 45-74, p. 279.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA).
Fumonisin. JECFA 47,2001. Disponível em:
 <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm>> Acesso em:
 13/03/2003.

KPODO, K. et al. Fusaria and Fumonisin in Maize from Ghana and their Co-occurrence with Aflatoxins. **Journal of Food Microbiology**, 61: 147-157, 2000.

L'VOVA, L. S. et al. Production of Fumonisin by *Fusarium moliniforme* Strains Isolated from Corn Grain. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 39(2): 197 – 201, 2003.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida**. São Carlos: Editora RiMa, 2004, 96 p.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. Campinas-SP: Editora Átomo, 2002. 278 p.

LI, F. et al. Aflatoxins and Fumonisin in Corn from the High-Incidence Area for Human Hepatocellular Carcinoma in Guangxi, China. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 49: 4122-4126, 2001.

LOGRIECO, A. et al. Toxigenic *Fusarium* species and Mycotoxins Associated with Maize Ear Rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, 108: 597 – 609, 2002.

LU, Y. et al. Characterization of Fumonisin B₁- Glucose Reaction Kinetics and Products. **J. Agric. Food Chem** (50): 4726-4733, 2002.

LU, Z. et al. Reaction with Fructose Detoxifies Fumonisin B₁ while Stimulating Liver-Associated Natural Killer Cell Activity in Rats. **J. Agric. Food Chem.**, 45: 803-809, 1997.

LUO, Y. et al. Comparative Study on the Natural Occurrence of *Fusarium* Mycotoxins (Trichothecenes and Zearalenone) in Corn And Wheat from High- and Low-Risk Areas for Human Esophageal Cancer in China. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 56(12): 3723-3726, 1990.

MAGAN, N. et al. Ecological Determinants of Mould Growth in Stored Grain. **International Journal of Food Microbiology**, 7: 245-256, 1988.

MAGNOLI, C. E. et al. Natural Occurrence of *Fusarium* Species and Fumonisin-production by Toxigenic Strains Isolated from Poultry Feeds in Argentina. **Mycopathologia**, Vol. 145: 35-41, 1999.

MALLMANN, C. A. et al. Equine Leukoencephalomalacia Associated with Ingestion of Corn Contaminated with Fumonisin B₁. **Revista de Microbiologia**, Vol. 30: 249-252, 1999.

MALLMANN, C. A. et al. Fumonisin B₁ Levels in Cereals and Feeds from Southern Brazil. **Arq. Inst. Biol.** Vol. 68: 41-45, 2001.

MARASAS; W. F. O. Discovery and Occurrence of the Fumonins: A Historical Perspective. **Environmental Health Perspectives**, vol 109, supl.2.: 239-243, 2001. Disponível em:<<http://ehp.niehs.nih.gov/members/2001/suppl-2/239-243marasas/marasas.pdf> > Acesso: 19 dez. 2004.

MARCIA, K., et al. Monitorament of Fungi in Corn, Grits and Corn Meal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol.18, no.4, p.363-367, 1998.

MARÍN, S. et al. Efect of Water Activity on Hydrolytic Enzyme Production by *Fusarium molinifirme* and *Fusarium proliferatum* During Colonization of Maize. **International Journal of Food Microbiology**, 42: 185-194,1998.

MARÍN, S. et al. Impact of *Fusarium moliniforme* and *F. proliferatum* Colonization of Maize on Calorific Losses and Fumonisin Production Under Different Environmental Conditions. **Journal of Stored Research**, 35: 15-26,1999a.

MARÍN, S. et al. Two-dimensional Profiles of Fumonisin B₁ Production by *Fusarium moliniforme* and *Fusarium proliferatum* in Relation to Environmental Factors and Potencial for Modeling Toxin Formation in Maize Grain. **International Journal of Food Microbiology**, 51: 159-167,1999b.

MATHEWS, C. K. and VAN HOLDE, K. E. **Biochemistry**. Redwod City: The Benjamin/Cummings Publishing Company., 1990. p. 617-621

MAZZANI, C. et al; Occurrence of *Fusarium moniliforme* and Fumonins in Kernels of Maize Hybrids in Venezuela. **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol. 32: 345-349. 2001.

MEDINA-MARTÍNEZ, M. S. et al; Mold Occurrence and Aflatoxin B₁ and Fumonisin B₁ Determination in Corn Samples in Venezuela. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 48: 2833-2836, 2000.

MENALDINO, D. S. et al. Sphingoid bases and de novo ceramide synthesis: enzymes involved, pharmacology and mechanisms of action. **Pharmacological Research**, 47: 373–381, 2003.

MERRILL JR., A. H. & LIOTTA, D. Fumonins: Fungal Toxins that Shed Light on Sphingolipid Function. **Trends in Cell Biology**. Vol. 6: 218-223, 1996.

MERRILL JR., A. H. De Novo Sphingolipid Biosynthesis: A necessary, But Dangerous, Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 277: 25843-25846, 2002.

MERRILL JR., A. H. et al. Sphingolipid Metabolism: Roles in Signal Transduction and Disruption by Fumonisin. **Environmental Health Perspectives**, vol 109, supl.2.: 283-289, 2001. Disponível em:< <http://ehp.niehs.nih.gov/members/2001/suppl-2/283-289merrill/merrill.pdf>> Acesso: 19 dez. 2004.

MERRILL JR., A. H. et al. Sphingolipids – The Enigmatic Lipid Class: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 142: 208-225, 1997.

MIDIO, A. F. and MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000, 295 p.

MILLER, J. D. Fungi and Mycotoxins in Grain: Implications for Stored Product Research. **Journal of Stored Products Research**, Vol 31(1): 1 – 16, 1995.

MILLER; J. D. Factors that Affect the Occurrence of Fumonisin. **Environmental Health Perspectives**, vol 109, supl.2.: 321-324, 2001. Disponível em:< <http://ehp.niehs.nih.gov/members/2001/suppl-2/321-324miller/miller-full.html>> Acesso: 16/01/2005.

MÖLLER, T. E. and GUSTAVSSON, H, F. Determination of Fumonisin B₁ and B₂ in Various Maize Products by a Combined SAX + C₁₈ Column and Immunoaffinity Column. **Journal of AOAC International**, Vol. 83 nº1: 99 -103,. 2000.

MUNKVOLD, G. P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**,. 109: 705 – 713, 2003.

MUNKVOLD, G. P. et al. Fumonisin in Maize – Can We Reduce Their Occurrence?. **Plant Disease**, Vol. 81 nº6: 556-565, 1997.

MURPHY, P. A. et al. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ Content of Iowa, Wisconsin, and Illinois Corn and Corn Screenings. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 41: 263-266, 1993.

MURRAY, R. K. et al. **Harper: Bioquímica**. Tradução por Ezequiel Waisbich e outros. São Paulo: Atheneu Editora., 2002. p. 166 -167, p. 264-267. Tradução de: Harper's Biochemistry, 2000.

NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTIC (NCHS) **Weight-for-age charts, 2 to 20 years, LMS parameters and selected smoothed weight percentiles in kilograms, by sex and age**, 2004. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nchs/about/major/nhanes/growthcharts/datafiles.htm>>. Acesso em: 23/03/05.

NELSON, P. E. et al. Production of Fumonisin by *Fusarium moliniforme* Strains from Various Substrates and Geographic Areas. **Applied and Environmental Microbiology**, 57(8): 2410 – 2412, 1991.

ONO, E. Y. S. et al. Effect of Climatic Conditions on Natural Mycoflora and Fumonisin Freshly Harvested Corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, 147: 139 – 148, 1999.

ORSI, R. B. et al. Mycoflora and Occurrence of Fumonisin in Freshly Harvested and Stored Hybrid Maize. **Journal of Stored Products Research**, 36: 75 – 78, 2000.

PARK, J. W. et al. Analysis of Heat-processed Corn Foods for Fumonisin and Bound Fumonisin. **Food Additives and Contaminants**, Vol. 21 nº12: 1168-1178, 2004.

PELCZAR, M. et al. **Microbiologia**. Tradução por Manuel Adolfo May Pereira. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. volume 1, cap.1, p.3-19, cap.3, p.313-344. Tradução de: Microbiology, 1977.

PERAICA, M. et al. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, 77(9), 1999. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/bulletin/1999/Vol77-No9/bulletin_1999_77\(9\)_754-766.pdf](http://whqlibdoc.who.int/bulletin/1999/Vol77-No9/bulletin_1999_77(9)_754-766.pdf)> Acesso em: 15 nov. 2004.

PETERSEN, A. et al; Preliminary Evaluation of Fumonisin by the Nordic Countries and Occurrence of Fumonisin (FB₁ and FB₂) in Corn-based Foods on Danish Market. **Food Additives and Contaminants**, Vol. 18 nº3: 221-226, 2001.

POLING, S. M. and PLATTNER, R. D. Rapid Purification of Fumonisin and Their Hydrolysis Products with Solid-Phase Extraction Columns. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 47: 2344-2349, 1999.

POZZI, C. R. et al. Aspectos relacionados à Ocorrência e Mecanismo de Ação de Fumonisin. **Ciência Rural**, 32(5): 901 – 907, 2002.

RHEEDER, J. P. et al. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**,. 68(5): 2101 – 2105, 2002.

RIBEIRO, E. P and SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004, cap. 1, p.10, cap 2, p. 49-50.

RICE, L. G. et al. Evaluation of Liquid Chromatographic Method for the Determination of Fumonisin in Corn, Poultry Feed, and *Fusarium* Culture Material. **Journal of AOAC International**, Vol. 78 nº4: 1002-1009, 1995.

RILEY, R. T. et al. Sphingolipid Perturbations as Mechanisms for Fumonisin Carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, vol 109, supl.2.: 301-306, 2001. Disponível em:<<http://ehp.niehs.nih.gov/members/2001/suppl-2/301-308riley/riley.pdf>> Acesso: 19 dez. 2004.

RITCHIE, S. W. et al. Como a planta de milho se desenvolve. Tradução por: Suzana Oellers Ferreira. **Informações agrônomicas** nº 103, arquivo do agrônomo - nº 15;

set. 2003. Tradução de: How a Corn Plant Develops, Special Report no 48, Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa, 1993. Disponível em: <[http://www.potafos.org/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/7759ddc6878ca7eb83256d05004c6dd1/\\$FILE/Encarte103.pdf](http://www.potafos.org/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/7759ddc6878ca7eb83256d05004c6dd1/$FILE/Encarte103.pdf)> Acessado em: 02/01/2005.

RITIENI, A. et al; Occurrence of Fusaproliferin, Fumonisin B₁, and Beauvericin In Maize from Italy. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 45: 4001-4016, 1997.

RODRÍGUEZ, D. B. and SABINO, M. Mycotoxin Research in Brazil: The Last Decade in Review. **Brasilian Journal of Microbiology**, 33: 1-11, 2002.

ROSKOSKY JR., R. **Bioquímica**. Tradução por João Paulo de Campos e outros. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1997. p. 174 - 178. Tradução de: Biochemistry, 1996.

SCOTT, P. M. et al. Stability and Problems in Recovery of Fumonisin Added to Corn-Based Foods. **Journal of AOAC International**. Vol. 77 n^o2: 541-545, 1994.

SCOTT, P.M. and KIM, E.-K. **The Effect of Matrix on Analytical Methodology for Fusarium Toxins**. In: SECOND CANADIAN WORKSHOP ON FUSARIUM HEAD BLIGHT, nov.2001. Ottawa (Ontario, Canada):CWFHB/CCF Session 2 - Toxicology, Quality and Impact on Industry, 2001. Disponível em: http://res2.agr.ca/ecorc/fusarium01/session2c_e.htm Acesso em 13/03/2003.

SEO, J. A. et al. Isolation and Characterization of Two New Type C Fumonisin Produced by *Fusarium oxysporum*. **Journal of Natural Products**, 59(11): 1003 – 1005, 1996.

SEO, J. and LEE, Y. Natural Occurrence of the C Series of Fumonisin in Moldy Corn. **Applied an Environmental Microbiology**, 65(3): 1331 – 1334, 1999.

SHEPHARD, G. S. Chromatographic Determination of the Fumonisin Mycotoxins. **J. of Chromatography**, Vol. 815: 31-39, 1998.

SHEPHARD, G. S. et al. Quantitative Determination of Fumonisin B₁ and B₂ by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **J. of Liquid Chromatography**, Vol. 13 n^o10: 2077-2087, 1990.

SHEPHARD, G. S. et al; Natural Occurrence of Fumonisin in Corn from Iran. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 48: 1860-1864, 2000.

SHETTY, P. H. and BHAT, R. V. A Physical Method for Segregation of Fumonisin-contaminated Maize. **Food Chemistry**, 66: 371 – 374, 1999.

SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000. cap.2, p. 25-99.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. cap.2, p. 19-24.

SKOOG, D. A. et al. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução por Dra. Ignez Caracelli e outros. Porto Alegre: Bookman, 2002. cap.26, p.597-619, cap.28, p.641-677. Tradução de: Principles of Instrumental Analysis, fifth edition.

SNUSTAD, D. P. and SIMMONS, M. J.. **Fundamentos de Genética**. Tradução por Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro: Editora Guanabara koogan S. A., 2001. cap. 14, cap. 28. Tradução de: Principles of Genetics, 1997.

STACK, M. E. Analysis of Fumonisin B₁ and Its Hydrolysis Product in Tortillas. **Journal of AOAC International**, Vol. 81 n^o4: 737-740, 1998.

SYDENHAM, E. W. et al. Determination of Fumonisin in Corn: Evaluation of Competitive Immunoassay and HPLC Techniques. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 44: 159-164, 1996b.

SYDENHAM, E. W. et al. Evidence for the Natural Occurrence of Fumonisin B₁. a Mycotoxin Produced By *Fusarium moniliforme*, in Corn. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 38: 285-290, 1990a.

SYDENHAM, E. W. et al. Fumonisin Contamination of Commercial Corn-Based Human Foodstuffs. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 39 n^o11: 2014-2018, 1991.

SYDENHAM, E. W. et al. Fumonisin-contaminated Maize: Physical Treatment for the Partial deContamination of Bulk shipments. **Food Addit. Contam.** 11(1): 25-32, 1994.

SYDENHAM, E. W. et al. Fumonisin Concentrations in Brazilian Feeds Associated with Field Outbreaks of Confirmed and Suspected Animal Mycotoxicoses. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 40: 994-997, 1992b.

SYDENHAM, E. W. et al. Fumonisin in Argentinian Field-Trial Corn. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 41 n^o6: 891-895, 1993.

SYDENHAM, E. W. et al. Liquid Chromatographic Determination of Fumonisin B₁, B₂ and B₃ in Corn: AOAC – IUPAC Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, Vol. 79 n^o3: 688-696, 1996a.

SYDENHAM, E. W. et al. Liquid Chromatographic Determination of Fumonisin B₁, B₂, and B₃ in Foods and Feeds. **Journal of AOAC International**, Vol. 75 n^o2: 313-318, 1992a.

SYDENHAM, E. W. et al. Natural Occurrence of Some *Fusarium* Mycotoxins in Corn from Low and High Esophageal Cancer Prevalence Areas of Transkei, Southern Africa. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 38: 1900-1903, 1990b.

THIEL, P. G. et al. Levels of Fumonisin B₁ and B₂ in Feeds Associated with Confirmed Cases of Equine Leukoencephalomalacia. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 39 nº1: 109-111, 1991b.

THIEL, P. G. et al. Survey of Fumonisin Production by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology.** 57(4): 1089 – 1093, 1991a.

TRUCKSSES, M. W. et al. Immunoaffinity Column Coupled with Liquid Chromatography for Determination of Fumonisin B₁ in Canned and Frozen Sweet Corn. **Journal of AOAC International,** Vol. 78(3): 705-710, 1995.

TSENG, T. and LIU, C. Occurrence of Fumonisin B₁ and B₂ in Corn-based Foodstuffs in Taiwan Market. **Mycopathologia,** Vol. 137: 57-61, 1997.

UENO, Y. et al. Fumonisin as a Possible Contributory Risk Factor for Primary Liver Cancer: A 3-Year Study of Corn Harvested in Haimen, China, by HPLC and Elisa. **Food and Chemical Toxicology,** Vol. 35: 1143-1150, 1997.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (1998). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-USP.** Versão 4.0. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela/index.asp> Acesso em 28/03/05.

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS. **Tabela brasileira de composição de alimentos / Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA) - UNICAMP.** Campinas: NEPA-UNICAMP, 2004.42p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/tabela_nepa.htm Acesso em: 28/03/05.

VAN DER WESTHUIZEN, L. et al. Fumonisin Contamination and *Fusarium* Incidence in Corn from Santa Catarina, Brazil. **J. Agric. Food Chem.** 51: 5574 – 5578, 2003.

VELLUTI, A. et al. The Effect of Fungal Competition on Colonization of Maize Grain by *Fusarium molinifirme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on Fumonisin B₁ and Zearalenone Formation. **International Journal of Food Microbiology,** 59: 59-66, 2000.

VINCELLI, P. et al. Fumonisin, Vomitoxin, and other Mycotoxins in Corn Produced by *Fusarium* Fungi. **UK Cooperative Extension Service – University of Kentucky – College of Agriculture,** Frankfurt, nov. 2002. Disponível em: <http://www.ca.uky.edu> Acesso em: 16 set. 2003.

VIQUEZ, O. M. et al. Occurrence of Fumonisin B₁ in Maize Grown in Costa Rica. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 44: 2789-2791, 1996.

VISCONTI, A. et al. Determination of Fumonisin B₁ and B₂ in Corn and Cornflakes by Liquid Chromatography with Immunoaffinity Column Clean up: Collaborative Study. **Journal of AOAC International,** Vol. 84(6): 1828-1837, 2001.

VOET, D. et al. **Fundamentos da Bioquímica**. Tradução por Arthur Germano Fett Neto e outros. Porto Alegre: Artmed., 2000. p. 226 - 228. Tradução de: *Fundamentals of Biochemistry*, 1999.

VOSS, K. A. et al. Comparative Subchronic Toxicity Studies of Nixtamalized and Water-extracted *Fusarium moliniforme* Culture Material. **Food and Chemical Toxicology**, Vol. 34: 623-632, 1996.

VOSS, K. A. et al. Effect of Baking and Frying on the Vivo Toxicity to Rats of Cornmeal Containing Fumonisin. **J. Agric. Food Chem.** 51: 5546 – 5551, 2003.

VOSS, K. A. et al. Fate of Fumonisin During the Production of Fried Tortilha Chips. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 49: 3120-3126, 2001.

WANG, E. et al. Fumonisin B₁ Consumption by Rats Causes Reversible, Dose-Dependent Increases in Urinary Sphinganine and Sphingosine. **Journal of Nutrition**. 129: 214 – 220, 1999.

WANG, E. et al. Inhibition of Sphingolipid Biosynthesis by Fumonisin. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 266 n^o22: 14486-14490, 1991.

WARE, G. M. et al. Determination of Fumonisin B₁ in Corn by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Analytical Letters**, Vol. 26 n^o86: 1751-1770, 1993

WARFIELD, C. Y. and GILCHRIST. D. G. Influence of Kernel Age on Fumonisin B₁ Production in Maize by *Fusarium moliniforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 65(7): 2853-2856, 1999.

WILLIAMS, L. D. et al. Fumonisin-ortho-phthaldehyde Derivate is Stabilized at Low Temperature. **Journal of Chromatography B**, *in press*. 2004. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 16/05/04.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Environmental Health Criteria 219 - Fumonisin B₁**, Geneva, 2000. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/en/ehc_219.pdf> Acesso em: 15 nov. 2004.

YOSHIZAWA, T. et al. Fumonisin Occurrence in Corn from High- and Low-Risk Areas for Human Esophageal Cancer in China. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 60(5): 1626-1629, 1994.

ANEXO

TABELA 23 - CONTAMINAÇÃO DE FB₁ E FB₂ EM CORNFLAKES

Código	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)	FB ₂ (mg.kg ⁻¹)	Total (FB ₁ + FB ₂) (mg.kg ⁻¹)	Marca
283/04	out-03	out-04	0,784	0,122	0,906	03a
285/04		nov-04	0,109	N.D.	0,109	03c
854/04		abr-05	traços	N.D.	traços	03c
855/04	ago-04	ago-05	N.D.	N.D.	N.D.	49a
858/04	set-04	jul-05	N.D.	N.D.	N.D.	07
924/04	set-04	set-05	traços	N.D.	traços	54
1013/04	jun-04	jun-05	0,129	N.D.	0,129	03a
F006/03		nov-03	0,537	0,076	0,613	03c
F016/04	jan-04	nov-04	0,172	0,78	0,25	07
F022/04	jan-04	nov-04	0,41	0,086	0,496	07
F039/04	mai-04	mar-05	N.D.	N.D.	N.D.	03a
F040/04	fev-04	fev-05	N.D.	N.D.	N.D.	03a
F041/04	set-04	fev-05	N.D.	N.D.	N.D.	49a
F042/04	nov-04	nov-05	N.D.	N.D.	N.D.	49a
F043/04	ago-04	ago-05	N.D.	N.D.	N.D.	49b
F044/04	out-04	out-05	N.D.	N.D.	N.D.	03b
F045/04		ago-05	N.D.	N.D.	N.D.	03c
F046/04	dez-04	out-05	traços	N.D.	traços	07
F047-04		jul-05	traços	N.D.	traços	03c
F048-04		jun-05	traços	N.D.	traços	03d

TABELA 24 - CONTAMINAÇÃO DE FB₁ E FB₂ EM CREME DE MILHO

Código	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)	FB ₂ (mg.kg ⁻¹)	Total (FB ₁ + FB ₂) (mg.kg ⁻¹)	Marca
307/04	mar-04	mar-05	0,998	0,537	1,535	11
808/04		dez-04	1,575	0,895	2,47	17
881/04	set-04	set-05	1,106	0,482	1,588	15
882/04		nov-04	1,528	0,718	2,246	30
892/04	set-04	set-05	0,992	0,397	1,389	42
894/04		jan-05	1,301	0,524	1,825	04
977/04	out-04	abr-05	1,114	0,493	1,607	38
1012/04		dez-04	2,354	1,086	3,44	04
1014/04		mar-05	0,593	0,251	0,844	37
1227/04	out-04	out-05	1,6	0,67	2,27	11
F009/03		set-03	2,559	0,73	3,289	04

TABELA 25 - CONTAMINAÇÃO DE FB₁ E FB₂ EM FARINHA DE MILHO

Código	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)	FB ₂ (mg.kg ⁻¹)	Total (FB ₁ + FB ₂) (mg.kg ⁻¹)	Marca
284/04	mar-04	dez-04	1,314	0,539	1,853	04
791/04		fev-06	0,681	0,346	1,027	10
792/04		mai-05	0,299	0,164	0,463	09
806/04		mai-05	0,188	0,17	0,358	01a
807/04	set-04	jun-05	0,203	0,147	0,35	04
817/04		mai-05	0,171	N.D.	0,171	09
856/04		jan-05	0,481	0,29	0,771	19
857/04		abr-05	traços	traços	traços	09
891/04		fev-05	0,232	0,198	0,43	21
893/04			0,348	0,235	0,583	11
1010/04	jul-04	jan-05	1,111	0,497	1,608	55
1011/04		mai-05	0,478	0,231	0,79	09
1229/04		jul-05	0,252	0,165	0,417	09
1230/04	set-04	jun-05	0,19	0,147	0,337	17
F011/03	fev-03	ago-03	1,955	0,094	2,049	04
F031/04		mar-05	0,202	0,154	0,356	01a
F032/04	jul-04	abr-05	0,267	0,17	0,437	04
F033/04	ago-04	mai-04	0,233	0,158	0,381	17
F034/04	ago-04	ago-05	0,266	0,169	0,435	15
F035/04		mai-05	0,22	0,152	0,372	09
F036/04		abr-05	0,302	0,207	0,509	09

TABELA 26 - CONTAMINAÇÃO DE FB₁ E FB₂ EM FLOCOS DE MILHO

Código	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)	FB ₂ (mg.kg ⁻¹)	Total (FB ₁ + FB ₂) (mg.kg ⁻¹)	Marca
266/04	nov-03	nov-04	1,175	0,359	1,534	28a
267/04		dez-04	0,964	0,304	1,268	28b
777/04		nov-04	0,422	0,261	0,683	13
778/04		mar-05	1,363	1,017	2,38	28b
779/04		jan-05	0,745	0,462	1,207	34
780/04		jan-05	0,874	0,413	1,287	21
810/04		mar-05	0,954	0,692	1,646	28b
811/04		fev-05	0,98	0,806	1,786	28c
834/04		mai-05	0,513	0,339	0,852	34
868/04		mai-05	0,637	0,468	1,105	28c
869/04		mai-05	0,188	0,149	0,337	02c
870/04		abr-05	0,362	0,205	0,567	09
871/04		fev-05	0,649	0,299	0,948	21
1225/04		nov-05	0,302	0,193	0,495	34
1226/04		jul-05	0,292	0,169	0,461	09
1234/04		mai-05	1,256	0,582	1,838	28b
F010/03		set-03	1,131	0,322	1,453	05
F029/04		dez-04	0,506	0,395	0,901	01a
F030/04		fev-05	0,73	0,512	1,242	05
F037/04		abr-05	0,28	0,181	0,461	09
F038/04		mar-05	0,298	0,201	0,494	34

TABELA 27.1 - CONTAMINAÇÃO DE FB₁ E FB₂ EM FUBÁ

Código	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)	FB ₂ (mg.kg ⁻¹)	Total (FB ₁ + FB ₂) (mg.kg ⁻¹)	Marca
793/03	mar-03	jul-03	0,931	0,227	1,158	13
794/03	jan-03	jul-03	1,036	0,3	1,336	13
795/03	abr-03	jul-03	0,646	0,212	0,858	13
796/03	mar-03	jun-03	0,562	0,178	0,74	13
860/03		dez-03	2,036	0,522	2,558	09
861/03	mai-03	ago-03	1,302	0,273	1,575	13
943/03		out-04	1,082	0,31	1,392	21
944/03		jan-04	2,17	0,512	2,682	17
954/03		dez-03	2,797	0,923	3,72	19
955/03		jun-04	1,942	0,454	2,35	14
976/03	mai-03	mai-05	4,736	1,438	6,174	16
977/03	mai-03	nov-03	1,654	0,635	2,289	09
978/03	mai-03	mai-04	0,785	0,212	0,998	12
979/03	out-03	mar-04	2,03	0,529	2,56	14
1014/03		fev-04	2018	623	2,804	01a
1015/03		nov-03	2,412	0,712	3,124	04
1023/03	mar-03	fev-04	1,723	0,554	2,278	15
1024/03		fev-04	1,721	0,441	2,162	17
1253/03		mai-04	0,787	0,199	0,986	14
1254/03		jul-04	1,934	0,904	2,838	18
1255/03		mar-04	2,93	0,721	3,651	14

TABELA 27.2 - CONTAMINAÇÃO DE FB₁ E FB₂ EM FUBÁ (CONTINUAÇÃO)

Código	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)	FB ₂ (mg.kg ⁻¹)	Total (FB ₁ + FB ₂) (mg.kg ⁻¹)	Marca
1403/03		abr-04	1,203	0,423	1,623	04
1421/03	ago-03	ago-04	0,896	0,32	1,216	11
1548/03		nov-03	1,963	0,584	2,547	19
1549/03	set-03	set-05	1,01	0,326	1,336	16
550/03	ago-03	ago-05	0,583	0,146	0,729	16
1551/03		mar-04	1,227	0,401	1,628	19
1552/03		set-05	0,664	0,276	0,94	16
1553/03		ago-04	0,816	0,285	1,101	14
1554/03		jun-04	0,912	0,325	1,238	20
1555/03	set-03	set-05	0,157	0,11	0,267	16
1626/03		mar-04	1,311	0,336	1,647	24
1627/03	out-03	mar-04	1,581	0,617	2,198	22
1675/03	dez-03	nov-04	2,04	0,503	2,543	12
1676/03		set-04	0,629	0,17	0,845	23
1677/03		out-04	1,04	0,244	1,284	18
1678/03		set-04	0,94	0,192	1,132	23
033/04	dez-03	dez-04	1,552	0,409	1,961	12
034/04		set-04	0,659	0,172	0,831	23
035/04		dez-03	1,345	0,353	1,698	09
263/04	mar-04	mar-05	1,101	0,315	1,416	26
264/04		jul-04	1,028	0,318	1,346	21
265/04		jan-05	1,058	0,261	1,319	27

TABELA 27.3 - CONTAMINAÇÃO DE FB₁ E FB₂ EM FUBÁ (CONTINUAÇÃO)

Código	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)	FB ₂ (mg.kg ⁻¹)	Total (FB ₁ + FB ₂) (mg.kg ⁻¹)	Marca
771/04	jun-04	set-04	1,011	0,772	1,783	56
772/04	ago-04	ago-05	0,433	0,31	0,743	11
773/04	ago-04	nov-04	0,503	0,323	0,826	57
774/04	ago-04	fev-05	0,242	0,169	0,411	38
775/04		dez-04	1,225	0,9	2,125	17
776/04	ago-04	ago-05	0,854	0,54	1,394	26
815/04		dez-04	1,987	1,513	3,5	17
816/04		fev-05	0,366	0,244	0,61	21
835/04	ago-04	fev-05	0,716	0,562	1,278	30
836/04	ago-04	fev-04	0,321	0,232	0,553	46
840/04		jan-05	0,891	0,736	1,627	24
841/04		jan-05	0,507	0,377	0,884	09
863/04	ago-04	fev-05	0,693	0,349	1,042	30
866/04	mai-04	mai-05	0,882	0,405	1,287	26
867/04	ago-04	mar-05	1,158	0,535	1,693	22
873/04	ago-04	fev-05	0,57	0,254	0,824	21
874/04	ago-04	ago-05	0,438	0,208	0,646	11
875/04	ago-04	ago-05	0,758	0,348	1,106	15
F008/03	fev-03	ago-03	2,334	0,481	2,815	01a

TABELA 28 - CONTAMINAÇÃO DE FB₁ E FB₂ EM MILHO PARA PIPOCA

Código	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)	FB ₂ (mg.kg ⁻¹)	Total (FB ₁ + FB ₂) (mg.kg ⁻¹)	Marca
1679/03		abr-05	0,14	N.D.	0,14	10
226/04		nov-04	0,462	0,508	0,97	09
575/04	jun-04	dez-04	0,643	0,389	1,032	26
576/04		dez-04	1,239	0,858	2,097	30
577/04		fev-05	0,629	0,535	1,164	28b
578/04	mai-04	mai-05	1,047	0,618	1,665	11
614/04	jul-04	jan-05	0,392	0,278	0,67	28a
615/04	ago-04	fev-05	0,349	0,223	0,586	15
616/04		mai-05	0,302	0,394	0,696	31
741/04	ago-04	fev-05	N.D.	N.D.	N.D.	09
750/04		fev-05	traços	N.D.	traços	04
761/04		fev-05	traços	N.D.	traços	38
762/04	set-04	mar-05	0,357	0,264	0,621	42
763/04		fev-05	0,418	0,263	0,681	04
795/04	ago-04	mai-05	N.D.	N.D.	N.D.	09
821/04		fev-05	0,406	0,263	0,669	38
822/04		fev-05	0,804	0,458	1,262	44
823/04		fev-05	0,631	0,353	0,984	45
900/04	jul-04	jan-05	0,351	0,257	0,608	46
901/04	mai-04	fev-05	0,201	0,144	0,345	53
F019/03	dez-03	set-04	0,333	0,124	0,457	01a
F020/03	dez-03	set-04	0,179	0,109	0,289	01a
F021/03		abr-80	0,345	0,162	0,507	10

TABELA 29 - CONTAMINAÇÃO DE FB₁ E FB₂ EM MILHO VERDE CONGELADO

Código	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)	FB₁ (mg.kg⁻¹)	Marca
259/04		jan-06	0,671	25
788/04		jun-06	N.D.	25
789/04	jun-04	jun-05	N.D.	41
809/04	fev-04	fev-05	N.D.	41
F002/03		jan-05	1,314	25
F014/03		nov-05	0,83	25
F023/04	abr-03	abr-05	N.D.	32
F024/04		mar-06	N.D.	25

TABELA 30 - CONTAMINAÇÃO DE FB₁ E FB₂ EM MILHO VERDE ENLATADO

Código	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)	FB₁ (mg.kg⁻¹)	Marca
765/04		dez-06	N.D.	35
766/04		jun-06	N.D.	36
812/04		jun-06	N.D.	36
818/04		jul-06	N.D.	43
864/04	mar-04	set-06	N.D.	50
865/04		jul-06	N.D.	51
1228/04	out-04	out-04	N.D.	39
1231/04		nov-06	N.D.	06a
1233/04	set-04	mar-07	N.D.	50
F003/03	mar-03	mar-05	1,449	06b
F004/03	fev-03	fev-05	1,02	39
F015/03		nov-05	0,441	06a
F026/04		set-06	N.D.	51
F027/04		mai-06	N.D.	06b
F028/04		jun-06	N.D.	06a

TABELA 31 - CONTAMINAÇÃO DE FB₁ E FB₂ EM MILHO VERDE IN NATURA

Código	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)	FB₁ (mg.kg⁻¹)	Marca
767/04	recebida mês 09/2004		N.D.	
769/04	recebida mês 09/2004		N.D.	
770/04	recebida mês 09/2004		N.D.	
813/04	recebida mês 09/2004		N.D.	
880/04	recebida mês 10/2004		N.D.	
F025/04	12/09/04	18/09/04	N.D.	33

TABELA 32 - CONTAMINAÇÃO DE FB₁ E FB₂ EM SNACKS DE MILHO

Código	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)	FB ₁ (mg.kg ⁻¹)	FB ₂ (mg.kg ⁻¹)	Total (FB ₁ + FB ₂) (mg.kg ⁻¹)	Marca
293/04		ago-04	0,185	0,201	0,386	29
294/04		ago-04	0,183	0,153	0,336	02b
781/04		nov-04	traços	traços	traços	40a
814/04		out-04	traços	N.D.	traços	40a
837/04		jan-05	0,231	0,157	0,386	47
838/04		jan-05	0,172	N.D.	0,172	02b
839/04	set-04	dez-04	traços	N.D.	traços	48
876/04		fev-05	0,155	N.D.	0,155	40a
877/04		dez-04	traços	N.D.	traços	09
878/04		nov-04	traços	N.D.	traços	02a
879/04		mar-05	0,176	traços	0,176	52
1232/04		fev-05	traços	N.D.	traços	02a
F005/03		jun-03	0,277	0,252	0,529	02a
F017/03	dez-03	abr-04	0,33	0,225	0,555	08
F049/04		abr-05	traços	traços	traços	40a
F050/04		jan-04	traços	traços	traços	40b
F051/04		abr-05	traços	traços	traços	09
F052/04		jan-05	0,155	traços	0,155	02a
F053/04		jan-05	traços	traços	traços	02d
F054/04		fev-05	traços	traços	traços	02e