UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JULIANA VICTORINO DA SILVA CRUZ

Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo

Pirassununga

2010

JULIANA VICTORINO DA SILVA CRUZ

Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

C957o	<p>Cruz, Juliana Victorino da Silva</p> <p>Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo / Juliana Victorino da Silva Cruz. -- Pirassununga, 2010. 73 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira.</p> <p>1. Micotoxinas 2. Alimentação animal 3. Cromatografia I. Título.</p>
-------	--

*Ao meu esposo Álvaro pela compreensão,
apoio, paciência e carinho nos momentos mais
difíceis, obrigado por favorecer e acreditar em
mais esta etapa de minha vida, minha eterna
gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, pela orientação, oportunidade, compreensão, atenção e dedicação.

Aos Professores Doutores Andrezza Maria Fernandes, Catarina Abdala Gomide, Eliana Setsuo Kamimura e membros da Banca Examinadora, pelos valiosos comentários e sugestões.

À Coordenação e a todos os Professores do Curso de Pós-Graduação, pela disposição e pelos ensinamentos transmitidos durante o Doutorado.

A Auxiliar Acadêmica Roice Eliana Rosim do Laboratório de Microbiologia e Micotoxina de Alimentos, do Departamento de Zootecnia e Engenharia e Alimentos, pelo auxílio, disposição e paciência.

A Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga-SP pela oportunidade e qualidade de ensino.

A Seção de Pós-Graduação (Conceição e Layla), pelos inúmeros esclarecimentos e auxílios.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, Márcia Izumi Sakamoto, Lígia Uribe, Aline Zampar, Thiago Previero, Celso Kawabata, Estela Kobashigawa e Jaqueline Akemi, pelo apoio e amizade incondicional que foram imprescindíveis para o término deste trabalho.

Ao meu irmão Augusto (*in memorian*), pela oportunidade de me conceder o primeiro estágio em Laboratório de Alimentos (Sadia), pela força, mesmo distante para que este ciclo de minha vida se encerre, ao meu irmão Ary pelo incentivo e amizade.

Aos meus pais, pelo amor, apoio e gratidão pela minha formação profissional.

Ao meu filho Arthur pelo incentivo de continuar quando pensava que
TUDO estava perdido.

À Deus pela vida e por mais uma vez, me acompanhar.

“Tudo o que chega, chega sempre por alguma razão”

Fernando Pessoa

RESUMO

CRUZ, J.V.S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo.** 2010. 73f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

O trabalho teve por finalidade pesquisar, quantitativamente, a ocorrência de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) e fumonisinas (B_1 e B_2) em alimentos industrializados à base de milho comercializadas nos municípios de Pirassununga, Porto Ferreira, Leme e Araras, Estado de São Paulo e milho em grão utilizado na fabricação de ração para animais de companhia (PET) coletado no município de Porto Ferreira, Estado de São Paulo. Para isto, foram colhidas, no período de setembro de 2006 a fevereiro de 2007, milho em grão, fubá e farinha de milho, pertencentes a quatro diferentes marcas comerciais, totalizando 72 amostras. Para ração animal, foram colhidas 24 diferentes amostras de milho em grão no período de março a junho/2008 de diferentes produtores rurais. A determinação de aflatoxinas e fumonisinas foi efetuada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Das 24 amostras comerciais analisadas, 23 de fubá (95,80%) e 20 de farinha de milho (83,30%), apresentaram concentração total de aflatoxinas abaixo de 5 $\mu\text{g/kg}$, apenas uma amostra de milho em grão (4,20%) apresentou níveis totais acima do permitido pela legislação brasileira (20 $\mu\text{g/kg}$). Para fumonisinas, 47 amostras (65,30%) apresentaram níveis acima dos limites de detecção (30 $\mu\text{g/kg}$), sendo que 15 amostras de milho em grão (62,50%), 16 de farinha de milho (66,70%), e 15 de fubá (62,50%), apresentaram-se positivas para FB_1 . Em relação ao milho destinado à fabricação de ração animal, 100% das amostras analisadas apresentaram concentração total de aflatoxinas abaixo de 5 $\mu\text{g/kg}$ e 100% apresentaram-se positivas para FB_1 . Os resultados do estudo foram utilizados para estimar o grau de exposição humana às aflatoxinas e fumonisinas, considerando as altas concentrações encontradas em produtos de milho e derivados comercializados na região de Pirassununga.

Palavras-chave: micotoxinas, alimentação animal, cromatografia.

ABSTRAT

CRUZ, J.V.S. **Occurrence of aflatoxins and fumonisins in corn-based products and in corn used as ingredient for pet feeds commercialized in the area of Pirassununga city, São Paulo State.** 2010. 73f. PhD Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

The objective of this study was to verify the occurrence of aflatoxins (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) and fumonisins (B_1 e B_2) in industrialized foods made with corn commercially traded in the cities of Pirassununga, Porto Ferreira, Leme and Araras, state of São Paulo, and corn used for the manufacture feeds intended for pet feeding in Porto Ferreira City, São Paulo State. Seventy-two samples of corn kernels, corn meal and corn flour of four different commercial brands were collected from September 2006 to February 2007. In the case of pet feeding, 24 samples of corn kernels regarding different rural producers were collected from March to June 2008. Analysis of aflatoxins and fumonisins were accomplished by high performance liquid chromatography (HPLC). From 24 commercial samples analyzed, 23 of corn meal (95.80%) and 20 of corn flour (83.30%) showed total aflatoxins levels below 5 $\mu\text{g/kg}$, and only one sample of corn in grain (4.20%) with total aflatoxins concentration above the tolerance limit adopted by Brazilian regulations (20 $\mu\text{g/kg}$). As for fumonisins, 47 (65.30%) samples showed detectable levels ($>30 \mu\text{g/kg}$), being 15 samples of corn in grain (62.50%), 16 of corn flour (66.70%), and 15 of corn meal (62.50%) positive samples for FB_1 . In the case of corn used as ingredient for pet feeds, 100% of analyzed samples showed total aflatoxins levels below 5 $\mu\text{g/kg}$, and 100% were positive for FB_1 . The results of this study were used for estimation of the human exposure levels to aflatoxins and fumonisins, taking into account the high concentrations found in corn and corn-based products in the region of Pirassununga.

Keywords: mycotosins, pet feeding, chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. . Estrutura química das Aflatoxinas (A) AFB1, (B) AFB2, (C) AFG1, (D) AFG2	11
Figura 2. Estrutura química da fumonisina B1-B4: R1= OH; R2= OH; R3= OH	16
Figura 3. Ranking da área colhida de milho no mundo (em mil hectares)	20
Figura 4. Localização do município de Pirassununga e respectiva região do Estado de São	29
Figura 5. Cromatograma da amostra industrializada de milho em grão (M16) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 0,01 µg/kg)	39
Figura 6. Cromatograma da amostra industrializada de milho em grão (M17) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 41,74 µg/kg)	40
Figura 7. Cromatograma da amostra industrializada de milho em grão (M10) contaminada com Fumonisinas (Somatória = 5.241 µg/kg)	40
Figura 8. Cromatograma da amostra industrializada de milho em grão (M21) sem contaminação por Fumonisinas.....	41
Figura 9. Cromatograma da amostra industrializada de fubá (FB11) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 12,78 µg/kg).....	41
Figura 10. Cromatograma da amostra industrializada de fubá (FB20) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 5,63 µg/kg)	42
Figura 11. Cromatograma da amostra industrializada de fubá (FB19) contaminada com Fumonisinas (Somatória = 2.489 µg/kg).....	42
Figura 12. Cromatograma da amostra industrializada de fubá (FB22) contaminada com Fumonisinas (Somatória = 1,182 µg/kg).....	43
Figura 13. Cromatograma da amostra industrializada de farinha de milho (FM16) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 4,09 µg/kg)	43
Figura 14. Cromatograma da amostra industrializada de farinha de milho (FM17) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 4,84 µg/kg)	44
Figura 15. Cromatograma da amostra industrializada de farinha de milho (FM11) contaminada com Fumonisinas (Somatória = 7.226 µg/kg)	44
Figura 16. Cromatograma da amostra industrializada de farinha de milho (FM21) contaminada com Fumonisinas (Somatória = 2,62 µg/kg)	45

Figura 17. Cromatograma da amostra de milho em grão para fabricação de ração animal (R1) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 1,64 µg/kg).....	52
Figura 18. Cromatograma da amostra de milho em grão para fabricação de ração animal (R1) contaminada com Fumonisinhas (Somatória = 6.672 µg/kg)	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis máximos permitidos para aflatoxinas em alimentos para consumo humano	14
Tabela 2. Milho Brasil: Estimativa de consumo por segmento (toneladas)	21
Tabela 3. Os múltiplos uso do Milho (planta, espiga e grão) no Brasil.....	24
Tabela 4. Quantidade de produtos industrializados à base de milho coletados nos municípios de Pirassununga, Porto Ferreira, Leme e Araras	30
Tabela 5. Determinação de Aflatoxinas em produtos industrializados à base de milho	36
Tabela 6. Determinação de Fumonisinias em produtos industrializados à base de milho.....	36
Tabela 7. Determinação de aflatoxinas em produtos industrializados à base de milho por região	36
Tabela 8. Determinação de fumonisinias em produtos industrializados à base de milho por região.....	37
Tabela 9. Determinação de aflatoxinas e fumonisinias em produtos industrializados à base de milho por região	37
Tabela 10. Determinação de aflatoxinas e fumonisinias em milho em grão para fabricação de ração para animais de companhia (PET).....	51
Tabela 11. Avaliação de risco pela exposição à aflatoxina B1 em fubá nas diversas regiões do Brasil, considerando a aquisição diária deste alimento pela Pesquisa de Orçamentos Familiares do IBGE e o resultado médio de 2,44 µg/kg coletada no município de Pirassununga	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.2 AFLATOXINAS	6
2.2.1 Conceito	6
2.2.2 Estrutura Química	10
2.2.3 Mecanismo de Ação das Aflatoxinas.....	11
2.2.4 Produção das Aflatoxinas em Alimentos	12
2.3 FUMONISINAS.....	14
2.3.1 Conceito	14
2.3.2 Estrutura Química	16
2.3.3 Mecanismo de Ação das Fumonisin.....	16
2.3.4 Produção das Fumonisin.....	18
2.4 MILHO	19
2.4.1 Produção Brasileira	21
2.4.2 Consumo Humano	22
2.4.3 Consumo Animal	24
2.5 ALIMENTAÇÃO DE ANIMAIS DE COMPANHIA (PET).....	25
2.6 ANÁLISES DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS	27
2.6.1 Amostragem.....	27
2.6.2 Métodos de análises de micotoxinas em alimentos	27
2.6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Área de Estudo e Abrangência	29
3.2 AMOSTRAGEM.....	30
3.2.1 Produtos Industrializados à Base de Milho	30
3.2.2 Milho para fabricação de ração para animais de companhia (PET)	31
3.3 ANÁLISES LABORATORIAIS	32
3.3.1 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras.....	32
3.3.2 Determinação de Fumonisin.....	33
3.3.3 Avaliação do Desempenho dos Métodos Analíticos.....	34
3.4 ESTIMATIVA DE CONSUMO DE MILHO E DERIVADOS	35

3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 PRODUTOS INDUSTRIALIZADOS À BASE DE MILHO.....	35
4.2 MILHO PARA FABRICAÇÃO DE RAÇÃO PARA ANIMAIS DE COMPANHIA (PET)	51
4.3 ESTIMATIVA DE CONSUMO DE MILHO E DERIVADOS	56
5. CONCLUSÕES	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	60

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos que se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios, capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos em animais vertebrados, incluindo o homem (COULOMBE, 1991). O termo micotoxina é empregado, também, para designar os produtos de biotransformação destes compostos pelo organismo humano e animal (SMITH; ROSS, 1991). Os fungos toxigênicos podem contaminar os alimentos nas diferentes fases de produção e beneficiamento, desde o cultivo até o transporte e armazenagem. Ressalta-se, ainda, o fato das micotoxinas apresentarem, de modo geral, grande estabilidade química, o que permite a sua persistência no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (CHU, 1991).

As enfermidades causadas pelas micotoxinas são denominadas micotoxicoses, as quais são caracterizadas por síndromes difusas, porém, com predomínio de lesões em determinados órgãos, como fígado, rins, tecido epitelial e Sistema Nervoso Central, dependendo do tipo de toxina. Existe, também, a possibilidade de ocorrência simultânea de duas ou mais micotoxinas, o que pode conduzir à potencialização de seus efeitos tóxicos sobre o organismo susceptível (POZZI, 2000). As micotoxinas de ocorrência freqüente em nossas condições incluem as aflatoxinas e as fumonisinas.

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (MOSS, 1998). Esses fungos apresentam distribuição mundial, com condições ideais de desenvolvimento entre 80-85% de umidade relativa e em temperatura ambiente ao redor de 30°C (COULOMBE, 1991). O Brasil, devido à prevalência de clima tropical, apresenta condições ideais para o desenvolvimento desses fungos. Além disso, observa-se ainda, no país, a utilização de práticas agrícolas inadequadas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenagem de cereais e grãos, que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos de modo geral, particularmente os toxigênicos (SABINO et al. 1988).

São conhecidos, atualmente, 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂ (COULOMBE, 1991). A aflatoxina B₁ (AFB₁), além de ser a mais freqüentemente encontrada em substratos vegetais, é a que apresenta maior poder toxigênico, enquanto que a toxicidade aguda das aflatoxinas B₂, G₁ e G₂ é cerca de 50, 20 e 10% da AFB₁, respectivamente (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995).

O conhecimento científico sobre as fumonisinas é relativamente menor, quando comparado às aflatoxinas, embora sua ocorrência seja também bastante freqüente. Com distribuição mundial, os fungos do gênero *Fusarium*, produtores de fumonisinas, são importantes patógenos de cereais em todas as suas fases de desenvolvimento, incluindo o período após a colheita quando os grãos são armazenados (DIAZ; BOERMANS, 1994). Esses fungos são capazes de produzir uma variedade de micotoxinas, entre elas as fumonisinas, as fusarinas, moniliformina, toxina T-2, ácido fusárico, deoxinivalenol, diacetoxiscirpenol e zearalenona (LI et al. 2000).

No Brasil, o papel do milho na alimentação humana e animal é importante e antigo. Mesmo antes da chegada dos colonizadores ao país, o milho já era cultivado e utilizado pelos indígenas. O milho é processado principalmente por duas vias: moagem a seco e moagem úmida, obtendo-se diferentes produtos destinados ao preparo de alimentos, farelos para rações e outros usos industriais.

O presente trabalho teve os seguintes objetivos: Determinar a concentração de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) e fumonisinas (B₁ e B₂) em amostras de milho em grão, fubá e farinha comercializadas em áreas urbanas nos municípios de Pirassununga, Porto Ferreira, Leme e Araras e milho em grão utilizado na fabricação de ração para animais de companhia (PET) colhido em propriedade rural, na cidade de Porto Ferreira; Avaliar comparativamente as diferenças entre as concentrações de aflatoxinas e fumonisinas obtidas nos diferentes tipos de produtos analisados; Determinar a Ingestão Diária Provável Média para aflatoxinas e fumonisinas em produtos comerciais à base de milho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MICOTOXINAS

Durante a década de 60 uma doença denominada “Turkey X” atacava e matava milhares de aves na Inglaterra sem uma causa aparente. Os prejuízos econômicos que esta doença causava acabaram facilitando a rápida identificação, inicialmente julgada como uma doença de caráter nutricional, visto que tortas de amendoim utilizadas como ração para perus estavam associadas com o aparecimento da doença, rapidamente relacionou-se a causa a uma substância produzida por um fungo, *Aspergillus flavus*, posteriormente nomeada como Aflatoxina, hoje um dos mais potentes carcinógenos conhecidos no mundo (FONSECA, 1999).

Desde a descoberta da aflatoxina, o estudo de micotoxinas (do grego *Mikes*=fungo, do latim *Toxicum*=veneno) vem ganhando importância mundial, principalmente por causarem prejuízos econômicos diretos e indiretos em indústrias de alimentos, tanto animal e humano (FONSECA, 1999). As micotoxinas são um grupo de metabólitos secundários, produzidos por alguns fungos toxigênicos. As micotoxinas são necessárias para o crescimento e provavelmente possuem a função de limitarem a competição, podendo ainda estar associadas à mudança na natureza física do alimento, no sabor, odor e aparência. Elas são produzidas, ainda que não exclusivamente, à medida em que o fungo atinge a maturidade. São moléculas um tanto quanto diferentes, com estruturas que variam de simples anéis heterocíclicos apresentando peso molecular de até 50 Da, a grupos de 6 a 8 anéis heterocíclicos irregularmente dispostos e com peso molecular total >500 Da e que não apresentam imunogenicidade. Estudos têm revelado a existência de, pelo menos, cerca de 400 diferentes micotoxinas (BETINA, 1984).

Os fungos toxigênicos podem desenvolver-se nos alimentos durante a sua produção, processamento, transporte e ou estocagem e, uma vez produzidas podem ser ingeridas, inaladas ou absorvidas pela pele, causando patologias e morte do homem e animais.

Os principais substratos para a produção dessas toxinas são os cereais, cujas perdas, segundo estimativa da Food and Agriculture Organization of the United

Nations (FAO) situam-se ao redor de 25% dos grãos produzidos. Existem muitos tipos de micotoxinas, sendo que seis são consideradas importantes do ponto de vista de saúde pública: aflatoxina (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), ocratoxina A, patulina, fumonisinas, deoxinivalenol e zearalenona (FAO, 1995).

A contaminação de rações e outros alimentos por micotoxinas pode variar de acordo com as condições ambientais (umidade do substrato e temperatura do ambiente), métodos de processamento, produção e armazenamento dos produtos. A temperatura é um dos principais fatores envolvidos nesse processo e, em grãos, a faixa viável para a sua produção situa-se entre 11 e 37°C. Os fungos toxigênicos podem contaminar os cultivos em crescimento, em consequência de danos causados por insetos e outros agentes e produzir toxinas antes da colheita, durante essa e após seu armazenamento. Períodos de seca durante o cultivo do milho também são apontados como predisponentes à produção de aflatoxinas (ZLOTOWSKI et al., 2004; MALLMANN; SANTURO; WENTZ, 1994).

O isolamento de fungos toxigênicos, a partir de alimentos, principalmente grãos, estocados em condições recomendadas, não significa obrigatoriamente risco imediato para consumo. Assim como a ausência de fungos em alimentos suspeitos não significa ausência de micotoxinas, ou seja, o fungo pode estar ausente, mas a toxina pode estar presente e ativa (PITT; HOCKING, 1997; OSBORNE, 1982). A maioria das micotoxinas é termorresistente e mantém sua toxicidade, mesmo após os processos de peletização de rações ou preparação de conservas (SOARES; FURLANI, 1996).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana e animal através da contaminação direta ou indireta de alimentos ou rações. A forma indireta ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxigênico, e mesmo que este tenha sido eliminado durante o processamento, as micotoxinas ainda permanecerão no produto final. A contaminação direta, por outro lado, ocorre quando o produto, o alimento ou a ração se torna contaminada por um fungo toxigênico com posterior formação de micotoxinas (FRISVAD; SAMSON, 1992).

Hoje, há um interesse aparente na comunidade médica a respeito da participação das micotoxinas em doenças humanas. Os estudos animais e a evidência epidemiológica indicam a participação definitiva dos fungos toxigênicos

como agente etiológico em doenças humanas. Além disso, o potencial para as micotoxinas produzirem metabólitos tóxicos está relacionado aos fatores de virulência envolvidos na patogenicidade da doença.

A exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimentos contaminados é questão de saúde pública no mundo todo (BRERA; MIRAGLIA; COLATOSTI, 1998), ocorrência de micotoxinas em alimentos e derivados não é um problema apenas de países em desenvolvimento. Micotoxinas afetam o agronegócio de muitos países, interferindo ou até mesmo impedindo a exportação, reduzindo a produção animal e agrícola e, em alguns países, afetando, também, a saúde humana. Além do que, são enormes os prejuízos econômicos que elas causam em toda a cadeia de produção, desde a produção primária, passando pelos processadores e comerciantes de alimentos. Essas toxinas são responsáveis por prejuízos de milhões de dólares anuais em saúde humana, animal e produtos agrícolas (HUSSEIN; BRASEL, 2001). A Organização Mundial para a Alimentação e Agricultura (FAO), estimou entre cinco e 10% o total de alimentos perdidos no mundo anualmente por fungos e micotoxinas e que 40% da redução da expectativa de vida em países pobres está relacionada com a existência de micotoxinas na dieta destas populações (FAO, 2006).

Nos países em desenvolvimento, o problema é ainda mais sério. Como os produtos de boa qualidade são normalmente exportados, aqueles de qualidade inferior, os quais apresentam níveis de micotoxinas superiores aos permitidos nos países importadores, são vendidos e consumidos no mercado interno, com riscos evidentes para a saúde da população (DAWSON, 1991).

Micotoxicose é o termo utilizado para definir qualquer enfermidade causada aos homens e animais pela exposição às micotoxinas. Os quadros tóxicos variam de acordo com a micotoxina, seu efeito dose-dependente, espécie animal e até mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie, é caracterizada por estar relacionada à alimentação, não é contagiosa, não é infecciosa e é sempre causada pelas toxinas produzidas por fungos (HUSSEIN; BRASEL, 2001). As micotoxinas estão associadas a síndromes crônicas, como imunossupressão e carcinogenicidade (MOSS, 1998).

Elas podem ser do tipo primária ou secundária, sendo que destas, a secundária pode ser mais difícil a identificação, devido aos baixos níveis de toxinas

na amostra não resultarem muitas vezes em um quadro clínico de micotoxicose específica, mas sim em um quadro de suscetibilidade exacerbada a infecções intercorrentes devido à imunossupressão ocasionada pela toxina (OSBORNE, 1982).

Os sinais e sintomas vão desde lesões de pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade ou genitotoxicidade, podendo chegar à morte. Podem apresentar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores (COLE; COX, 1981; JECFA, 1995; 1998, 2001). Podem afetar diferentes sistemas do homem e/ou animal, acometendo um só sistema, como por exemplo, o imunológico, ou diversos simultaneamente.

O fato das micotoxinas causarem prejuízos de ordem econômica tem aumentado o interesse tanto da ciência, quanto da indústria nacional, em elucidar o conhecimento e amenizar os efeitos deletérios destas substâncias. Pesquisas vêm sendo feitas no país, em sua maioria, mostrando relatos de ocorrência de micotoxinas em alimentos. Muito pouco tem sido feito para se quantificar e analisar, de um ponto de vista holístico, o impacto das micotoxinas em alimentos no Brasil.

As investigações sobre incidência de micotoxinas em alimentos e rações são de suma importância para que esforços possam ser concentrados na prevenção, no controle da contaminação ou na destoxificação dos produtos susceptíveis a esse tipo de contaminação. Neste sentido, e com a finalidade de garantir a confiabilidade dos resultados, relativos à incidência de micotoxinas em alimentos, estudos visando aprimorar a metodologia para sua detecção e quantificação são, sem dúvida, urgentes e necessários (SILVA et al., 2005).

2.2 AFLATOXINAS

2.2.1 Conceito

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* spp, espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus* (MOSS, 1998). A incidência das aflatoxinas é relativamente maior em países de clima tropical ou subtropical, onde a temperatura e a umidade são favoráveis para o crescimento dos fungos (MOSS, 1998).

Antes de 1960, o interesse nas espécies do grupo *Aspergillus flavus* se concentrava apenas no uso de algumas estirpes no processamento de alimentos na Europa e no Oriente, além da habilidade de alguns isolados no parasitismo de

insetos (BEUCHAT, 1978). O termo aflatoxina foi formado a partir do nome do seu principal agente produtor (**Aspergillus flavus toxina**). As principais aflatoxinas conhecidas são denominadas de B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂), com base na fluorescência delas sob a luz ultravioleta e na sua mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada. Duas outras micotoxinas M₁ (AFM₁) e M₂ (AFM₂) foram detectadas no leite, urina e fezes de mamíferos, resultantes do metabolismo das toxinas B₁ e B₂, respectivamente (FONSECA, 1999). Sua importância se deve aos danos provocados à saúde humana e animal, e também aos prejuízos econômicos na agricultura em relação a perdas principalmente relacionadas a aves domésticas devido à diminuição de produtividade (LAZZARI, 1993; MILLER, 1995).

Os sinais da intoxicação por aflatoxinas depende principalmente de sua concentração no alimento, do tipo de aflatoxina e do tempo de ingestão. São toxinas potentes ao fígado e a maioria das espécies animais expostas a estas micotoxinas mostram sinais da doença que variam de agudo (letais ou não) e subagudos. O efeito agudo é de manifestação e de percepção rápidas, podendo levar o animal à morte causando reações irreversíveis, resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é o resultado da ingestão de doses não elevadas que provoca distúrbios e alterações nos órgãos do homem e dos animais, especialmente no fígado. Ambos os casos dependem da espécie animal, idade, do estado nutricional, e também do sexo (TEIXEIRA, 2008).

A aflatoxina B₁ é considerada atualmente como a mais tóxica e com maior poder carcinogênico dentre as micotoxinas (IARC, 1997), além de ser também a mais frequentemente encontrada em alimentos e diversas espécies de animais. Os machos são mais susceptíveis do que as fêmeas, ao passo que, em geral, a sensibilidade é acentuadamente maior nos jovens do que nos adultos (CHU, 1991). A AFB₁ é genotóxica, sendo considerada um dos mais potentes agentes mutagênicos naturais. Em consequência, a carcinogênese hepática representa o mais importante efeito de toxicidade crônica das aflatoxinas. Esta capacidade tem sido demonstrada extensivamente, sobretudo em relação à AFB₁, em muitas espécies animais, incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas (BUSBY; OGAN, 1984), bem como diferentes problemas em homens e animais. Além dos problemas citados, está comprovada a sua relação com a incidência da hepatite B e

do “*Kwashiorkor*”, é uma afecção que mata milhares de crianças em países subdesenvolvidos, causado por uma carência protéica cujos sintomas são: letargia, retardamento mental, anemia, despigmentação da pele, perda de cabelo ou descoloração do mesmo (BURGUERA, 1986; WONG, 1989). Pesquisadores tem apresentado hipóteses de que a “*Kwashiorkor*” pode ser resultado da intoxicação aguda por aflatoxinas. Todos esses problemas, dependem da quantidade e frequência da ingestão de produtos com aflatoxinas (TEIXEIRA, 2008). Uma vez ingerida na dieta, a aflatoxina B₁ pode ser convertida em um epóxido, possivelmente carcinogênico e conhecido por reagir com um resíduo da guanina no DNA (SILVA et al., 2005).

Com base nos estudos disponíveis, a International Agency For Research On Câncer (IARC) concluiu, em 1987, existiam evidências suficientes para classificar a AFB₁ como pertencente à classe um (carcinógeno humano) (ROTHSCHILD, 1992).

Em países da África e da Ásia, como Moçambique, por exemplo, onde ocorre o consumo regular de alimentos contaminados por aflatoxinas, a incidência de câncer no fígado é de aproximadamente, 13 casos por 10.000 habitantes por ano (FONSECA, 2006).

O Carcinoma Hepatocelular (CHC) é uma das neoplasias malignas mais comuns em todo o mundo (CARREIRO, 2004), apresentando, porém, uma acentuada variação geográfica no que concerne à incidência, com predomínio de alguns países da África, Ásia e ilhas do Pacífico. A incidência de CHC é maior em homens do que em mulheres, predominantemente na faixa etária de 30 a 50 anos (TEIXEIRA, 2008)

Aproximadamente 250.000 mortes são causadas por CHC anualmente na China e na África sub-saariana e são atribuídas as fatores de riscos entre as quais a aflatoxinas e o vírus da hepatite B (HUSSEIN; BRASEL, 2001). As diferenças extremas observadas na incidência de CHC entre os diversos países sugerem o envolvimento de fatores ambientais em sua etiologia (HARRIS, 1991).

O quadro clínico da aflatoxicose está diretamente relacionado ao grau de contaminação do produto, tempo e quantidade de ração contaminada ingerida pelo animal e seu estado nutricional (Miller et al. 1982, Diekman; Green, 1992, Mallmann et al. 1994, Osweiler 1999). São relatados atraso no crescimento, carcinogênese, imunossupressão, teratogênese e hepatopatias agudas, subagudas e crônicas

(Schoenau et al. 1994). Suínos e caninos são as espécies mais sensíveis, sendo normalmente animais jovens os mais afetados pela aflatoxicose (Mallmann et al. 1994). Na suinocultura, a aflatoxicose subclínica é responsável por desempenho produtivo baixo e também pela ocorrência de doenças oportunistas associadas com imunossupressão, levando a grandes prejuízos econômicos. (Mallmann et al. 1994). Perdas econômicas consideráveis, por baixo desempenho e imunossupressão, são observadas também na circovirose (SEGALÉS et al. 2004).

Bioquimicamente, as aflatoxinas podem afetar o metabolismo de energia, de carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e das proteínas (BRADBURN; COKER, 1993; ELLIS; SMITH; SIMPSON, 1991). A sua toxicidade pode ser aguda para o fígado, e alguns dos efeitos nocivos da exposição podem ser a hepatocarcinogênese, teratogênese, mutagênese, imunossupressão, efeito anticoagulante, anemia e diminuição da fertilidade (BUTLER, 1974), enquanto que a toxicidade aguda das aflatoxinas G₁, B₂ e G₂ é cerca de 50, 20 e 10% da AFB₁, respectivamente (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). As aflatoxinas caracterizam-se como um problema freqüente para a produção avícola, seus efeitos tóxicos incluem redução da atividade de enzimas pancreáticas, diminuição da concentração de bile (WYATT, 1993), aumento da incidência de problemas de pernas, lesões no nervo ciático (LEESON; SUMMERS, 1988) e antagonismo ao metabolismo de vitaminas, proteínas, aminoácidos, lipídios e carboidratos, agindo sobre coenzimas ou complexos enzimáticos, principalmente no fígado, além de afetar a estrutura química do DNA (KIESSLING, 1986; KURATA, 1990). Um dos principais efeitos dessa toxina é a inibição da síntese protéica, causando assim uma queda no nível de proteínas plasmáticas, principalmente α e β globulinas, e albuminas (SANTIN, 2000).

Devido ao potencial risco à saúde humana, os níveis de aflatoxinas são monitorados em muitos países. Segundo Van Egmond (2003) e FAO (2004), aproximadamente 99 países possuem legislação para presença de aflatoxinas em alimentos e/ou rações, um aumento de 30% comparado a última publicação de 1995, sendo que, a população total desses países representa 87% da população mundial. Em 1995, 23% da população mundial faziam parte da região que não tinha vigente nenhum tipo de regulamento para micotoxinas. Em 2003 existiam mais micotoxinas regulamentadas em um maior número de produtos básicos, e os produtos que não possuíam regulamentação para aflatoxinas continuaram com os mesmos valores de

limites toleráveis ou tenderam a diminuição dos limites toleráveis. Agora todos os 99 países apresentam regulamentação para micotoxinas e apresentam limites para aflatoxinas em alimentos e/ou rações.

2.2.2 Estrutura Química

Em virtude da capacidade de se ligarem ao DNA das células, as aflatoxinas afetam a síntese protéica, além de contribuírem para a ocorrência da aplasia tímica (ausência congênita do timo e das paratireóides, com conseqüente deficiência da imunidade celular; também conhecida como síndrome de Di George) (RAISUDDIN, 1993). Uma vez ingerida na dieta, a aflatoxina B₁ pode ser convertida em um epóxido, possivelmente carcinogênico e reagir com um resíduo da guanina no DNA.

Através de estudos de prevalência concluiu-se que a contaminação de grãos por fungos aflatoxigênicos como *A. flavus* é predonimante sobre *A. parasiticus* e sua produção é favorecida por temperaturas entre 23-26°C e umidade relativa do ar acima de 75% sendo que a umidade relativa do ar acima de 85% e temperatura acima de 27°C favorecem o crescimento e a produção de aflatoxinas (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002). As aflatoxinas tem o ponto de fusão alto, são estáveis ao calor, sendo decompostas à temperatura de 220°C (SCUSSEL, 1984).

Assim como outros compostos heterocíclicos, são substâncias fluorescentes com características próprias. Tanto a aflatoxina B₁ como a aflatoxina B₂ apresentam uma fluorescência azul (B=*Blue*), enquanto que a AFG₁ e a AFG₂ apresentam uma fluorescência verde amarelada (G=*Green*) sob luz ultravioleta (HUSSEIN; BRASEL, 2001). São bisfuranocumarinas derivadas de decacetídeos, pela via biossintética dos policetídeos, na qual a unidade C2 é perdida durante a formação dos anéis bisfuranos (SMITH; MOSS, 1985).

Figura 1. . Estrutura química das Aflatoxinas (A) AFB₁, (B) AFB₂, (C) AFG₁, (D) AFG₂
 Fonte: Hussein e Brasel, 2001.

A série G das aflatoxinas diferem quimicamente da B pela presença de uma anel 3-lactona no lugar do anel ciclopentanona. Uma dupla ligação 8, 9 é encontrada na forma de um éter vinil no anel terminal furano nas aflatoxina B₁ e G₁ e não em B₂ e G₂. Essas variações que diferem as aflatoxinas estruturalmente estão associadas também as suas atividades, sendo AFB₁ e AFG₁ carcinogênicas e consideravelmente mais tóxicas que AFB₂ e AFG₂ (JAIMEZ et al., 2000).

Pode-se classificar as aflatoxinas como compostos de natureza cristalina, termoestáveis e solúveis em solventes polares, como o clorofórmio e metanol. São destruídas totalmente na presença de soluções fortemente alcalinas, como a amônia e o hipoclorito (OPAS, 1983).

2.2.3 Mecanismo de Ação das Aflatoxinas

A absorção das aflatoxinas ocorre no trato gastrointestinal e a sua biotransformação ocorre primariamente no fígado, por enzimas microssomais do sistema de funções oxidases mistas, associadas ao citocromo P-450 (BIEHL; BUCK, 1987). A AFB₁ é considerada uma das substâncias mais tóxicas para o fígado, sendo este o principal órgão atingido (OSWEILER, 1990).

Existe atualmente consenso entre grande número de especialistas, de que a AFB₁, é na verdade um pró-carcinogênico, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; OGIDO, 2003)

A sensibilidade aos efeitos das aflatoxinas varia consideravelmente entre as espécies animais. Mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie, a relação dose-resposta pode variar de acordo com raça, sexo, idade e composição da dieta, entre outros fatores (COULOMBE, 1991). Para muitas espécies, os machos são mais susceptíveis do que as fêmeas e em geral a sensibilidade é acentuadamente maior nos jovens do que nos adultos (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). Está comprovada a sua relação com a incidência da Hepatite B e do “*kwashiorkor*”, que é uma afecção que mata milhões de crianças nos países subdesenvolvidos e pode ser causado por uma carência protéica cujos sintomas são letargia, retardamento mental, anemia, despigmentação da pele, perda de cabelo ou descoloração do mesmo (BURGUER, 1986; WONG, 1998). Pesquisadores têm apresentado a hipótese de que o “*kwashiorkor*” pode ser resultado de uma intoxicação aguda por aflatoxina. No Brasil, tem sido verificada a presença de altos níveis de contaminação em vários alimentos destinados ao consumo humano e animal (PRADO, 1983; SYLOS, 1994).

Os sinais da intoxicação por aflatoxinas depende principalmente de sua concentração no alimento, do tipo de aflatoxina e do tempo de ingestão (DOERR; HAMILTON, 1983). Podem caracterizar-se pela elevada toxidez que apresentam. Em Saúde Animal, várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos efeitos tóxicos agudos, mutagênicos e carcinogênicos (OSWEILER, 1990).

2.2.4 Produção das Aflatoxinas em Alimentos

Verifica-se maior ocorrência de aflatoxinas em produto vegetal oriundo de debulha manual, ensacado e armazenado com uma umidade elevada e quando se reumedece o produto depois de seco. Essa toxina pode ser encontrada em muitos produtos, tais como amendoim, milho, sementes oleaginosas, nozes, trigo, feijão etc. Estudos sobre a ocorrência de aflatoxinas em diversos produtos mostram que o amendoim, o milho e a semente de algodão são os mais suscetíveis à contaminação (FONSECA 1984, JELINEK 1988). O número de trabalhos que avalia a contaminação fúngica e por micotoxinas em grãos vem crescendo no Brasil principalmente no Estado de São Paulo, em alimentos destinados ao consumo humano e animal, como amendoim e derivados, milho, feijão e rações (RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002).

Programas de monitoramentos dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas são essenciais para estabelecer prioridades em ações de vigilância sanitária. No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. Este limite é comparável aos estabelecidos por outros países e recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002).

A contaminação de produtos, como milho, amendoim, castanha-do-Brasil e outros, por aflatoxinas, vem dificultando a exportação dos mesmos a países desenvolvidos, onde há rígido controle dos limites de tolerância de aflatoxinas.

A falta de Boas Práticas Agrícolas, bem como as condições tropicais de temperatura e umidade elevadas, propicia o desenvolvimento fúngico, principalmente no milho, que constitui um ótimo substrato, rico em carboidratos. Durante o armazenamento, essa atividade fungica, pode levar a rápida deterioração na qualidade nutricional dos grãos e à contaminação por micotoxinas (MAGAN; ALDRED, 2007).

Os insetos e fungos são provavelmente os mais importantes organismos que provocam a deterioração. Eles podem afetar cor, odor, sabor, valor nutricional, bem como produzir micotoxinas, como as aflatoxinas (SABINO, 1996).

Considerando a toxicidade das aflatoxinas, o Brasil através do Ministério da Saúde, estabeleceu através da resolução RDC nº 274, em concordância com o Ministério da Agricultura, o limite máximo de 20 µg/kg, dado pela somatória de $B_1+B_2+G_1+G_2$, sendo válido para amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim (ou manteiga de amendoim) e milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído, farinhas e sêmolos) e 50 µg/kg para ração animal (BRASIL, 2002). A Tabela 1 apresenta os limites máximos para o consumo humano em vários países.

Tabela 1. Níveis máximos permitidos para aflatoxinas em alimentos para consumo humano

PAÍS	NÍVEL MÁXIMO μg/kg	ALIMENTO	FONTE
União Européia	2 (B ₁); 4 (total)	Cereais e produtos processados	(3)
Austrália	5 (total)	Todos os alimentos	
Brasil	20 (total)	Amendoim e derivados de milho	(1)
Índia	30 (total)	Todos os alimentos	
Japão	10 (total)	Todos os alimentos	
Singapura	0	Todos os alimentos	
África do Sul	5 (B ₁); 10 (total)	Todos os alimentos	
Suécia	5 (total)	Todos os alimentos	
Estados Unidos	20 (total)	Todos os alimentos	(2)
Alemanha	2 (B ₁); 4 (total); 0,05 (total)	Todos os alimentos Alimentos infantis	

Fonte: FONSECA, 2006

- (1) Resolução RDC nº 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002. Portaria nº 183, de 21 de março de 1996. Ministério da Agricultura.
- (2) FAO: WORLDWIDE REGULATIONS FOR MYCOTOXINS 1995
- (3) Directive nº 2005/9/CE de 28 de janeiro de 2003

2.3 FUMONISINAS

2.3.1 Conceito

As fumonisinas são metabólitos secundário do gênero *Fusarium* o qual se destaca como um dos mais importantes em termos de perdas globais devido às micotoxicoses (SMITH; SEDDON, 1998). Isso se deve ao fato desse gênero ter a capacidade de produzir uma variedade de micotoxinas, sendo as mais importantes os tricotecenos (vomitoxina e T-2 entre outras), as fumonisinas, a zearalenona, a moniliformina e o ácido fusárico.

Inicialmente descritas e caracterizadas em 1988 (BEZUIDENHOUT et al. 1988; GELDERBLOM et al. 1988), essas substâncias são produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*, especialmente por *Fusarium verticillioides* (anteriormente classificado como *Fusarium moniliforme*), *Fusarium proliferatum* e *Fusarium nygamai*, além da *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (BENNETT e KLICH, 2003). Outras espécies, tais como *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F.*

subglutinans, *F. polyphialidicum* e *Fusarium oxysporum* têm sido incluídos no grupo de produtores dessas micotoxinas (POZZI et al. 2002). As fumonisinas constituem um grupo o qual engloba, até o momento, 25 substâncias denominadas de B₁ (FB₁, FB₂, FB₃ e FB₄), A₁, A₂, A₃, AK₁, C₁, C₃, C₄, P₁, P₂, P₃, PH_{1a} e PH_{1b} (MUSSER; PLATTNER, 1997; AH-SEO; WON LEE, 1999), no entanto, a que se encontra em maior abundância é a fumonisina B₁ (FB₁), sendo também a mais tóxica, representando cerca de 70% da contaminação total dos alimentos e rações naturalmente contaminados (MALLMANN et al., 2001), seguindo-se a FB₂ e a FB₃.

No Brasil, existem poucos relatos sobre a incidência de fusariotoxinas, entretanto Castro; Soares e Furlani (1995) apresentam que a micoflora dos grãos de milho do estado de São Paulo constitui-se, predominantemente, de fungos do gênero *Fusarium*, tendo esse gênero incidência muito maior que o *Aspergillus*. Em adição, Orsi; Correa e Pozzi (1995) demonstram que dentre o gênero *Fusarium*, a espécie *Fusarium moniliforme* é a mais freqüente. Considerando essa população fúngica e que as fusariotoxinas são produzidas, na sua maioria, sob alta umidade e em temperaturas de aproximadamente 20 a 26°C, o clima brasileiro oferece boas condições para que essas toxinas estejam presentes nos grãos, causando inclusive várias doenças, como a podridão de sementes e colmo, estas espécies, que invadem a planta no campo, pode também ser encontradas no armazenamento, caso as condições de temperatura e umidade sejam adequadas (ORSI et al., 2000).

A primeira descrição sobre a ocorrência natural de FB₁ foi realizada por Sydenham et al. (1990) a partir de milho mofado colhido de uma área em Transkei, Sul da África, que apresentava alta incidência de câncer de esôfago em humanos. Os níveis detectados nas amostras variavam de 44 a 83 µg/g. O milho proveniente de algumas regiões da África, com histórico da doença, apresentaram altos níveis de contaminação (117 µg/g), segundo análises realizadas por Thiel; Marasas e Sydenham (1992). Linxian, província de China, é considerado uma área de elevado risco de câncer esofágico. Os níveis de FB₁ e de FB₂ no milho consumido pela população variam de 0,19 a 2,96 µg/g e 0,30 a 0,55 µg/g, respectivamente (YOSHIZAWA; YAMASHITA; LUO, 1994)

2.3.2 Estrutura Química

Ao contrário de outras micotoxinas, as quais são solúveis em solventes orgânicos, as fumonisinas são hidrossolúveis, o que tem dificultado seu estudo. É provável que muitas outras micotoxinas permaneçam ainda desconhecidas, graças a essa característica de hidrossolubilidade. A fumonisina B₁, a mais estudada delas, é um diéster de propano 1,2,3 - ácido tricarbóxico e 2 - amino - 12, 16 dimetil-3,5,10,14,15 - pentahidroxicosano em que nos C14 e C15 os grupos hidroxilas são esterificados com o grupo carboxiterminal de propano 1, 2, 3 - ácido tricarbóxico (BEZUIDENHOUT et al., 1988). A hidrólise das fumonisinas, através do aquecimento com ácido hidrolórico 6M ou hidróxido de potássio 0,05 e 2M produz ácido tricarbóxico e o aminopoliol correspondente (SCOTT, 1993).

Fumonisina B1: R1=OH; R2=OH; R3=OH
Fumonisina B2: R1=OH; R2=OH; R3=H
Fumonisina B3: R1=H; R2=OH; R3=OH
Fumonisina B4: R1=H; R2=OH; R3=H

Figura 2. Estrutura química da fumonisina B1-B4: R1= OH; R2= OH; R3= OH

Fonte: Scussel, 1996

2.3.3 Mecanismo de Ação das Fumonisinias

O caráter carcinogênico das fumonisinas parece não envolver uma interação com o DNA (COULOMBE, 1993). Por outro lado, sua semelhança com a esfingosina

sugere uma provável intervenção na biossíntese de esfingolipídios (SHIER, 1992). Segundo Wang et al. (1991), a FB₁ interfere na biossíntese de esfingolipídeos, os quais são importantes para a integridade da membrana celular e para a comunicação intercelular. A biossíntese dos esfingolipídeos ocorre no retículo endoplasmático, onde as fumonisinas parecem inibir a enzima N-aciltransferase. Assim, a FB₁ causa a depleção dos esfingolipídeos, provocando uma diminuição da divisão celular. A inibição desta enzima conduz ao acúmulo de esfinganina e esfingosina livres nas células, sendo este considerado como o mecanismo primário de ação tóxica das fumonisinas. O mecanismo de toxicidade consiste na inibição da ceramida sintetase, enzima responsável pela síntese de esfingolipídios. Essa inibição acarreta aumento da concentração de esfinganina e esfingosina no soro dos animais expostos a esta micotoxina (WANG et al. 1991). Desta forma, a toxicidade da FB₁ é conhecida em diversas espécies de animais domésticos.

A inibição da biossíntese dos esfingolipídios acarreta enormes problemas à atividade celular, uma vez que essas substâncias são essenciais para a composição da membrana, para a comunicação célula a célula, para a interação intracelular e a matriz celular e para os fatores de crescimento, como mensageiro de vários fatores, incluindo fator de necrose de tumor, interleucina um e fator de crescimento de nervos. No Brasil, essas micotoxinas já foram detectadas em vários substratos, especialmente no milho para ração animal (HIROOKA; YAMAGUCHI, 1994; HIROOKA et al., 1991;1996). Apenas as fumonisinas FB₁, FB₂ e FB₃ foram detectadas no milho naturalmente contaminado. Geralmente, os alimentos contaminados apresentam a concentração de FB₁ entre 0,05 e 5,00 mg/kg.

Das fumonisinas identificadas até aqui, as FB₁, FB₂ e FB₃ são as mais isoladas em alimentos naturalmente contaminados, sendo que a FB₁ representa cerca de 70% da concentração total das fumonisinas detectadas (SYDENHAM et al., 1991). Em humanos o consumo de alimentos contaminados por FB₁ vem sendo estatisticamente relacionado à incidência de câncer esofágico na região de Transkei, África do Sul, com ingestão de milho contendo altas concentrações de fumonisinas, comercializados em supermercados. A cidade Charleston (Carolina do Sul) tem sido relacionada com o maior índice de ocorrência de câncer de esôfago entre afro-americanos nos Estados Unidos. Os autores reportaram a ocorrência de FB₁ em níveis de até 118,00 mg/kg (SYDENHAM et al., 1991). A International Agency for

Research on Câncer (IARC) classificou a fumonisina no grupo 2B, considerando-a como possível ação carcinogênica em seres humanos embora não haja ainda evidências suficientes para confirmar seu envolvimento na etiologia de câncer humano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Desde a sua identificação, as fumonisinas têm sido associadas com doenças animais como a Leucoencefalomalácia Equina (LEME) e o edema pulmonar suíno (DIAZ; BOERMANS, 1994). A Leucoencefalomalácia eqüina (LEME) é uma doença não infecciosa esporádica e altamente fatal que afeta o Sistema Nervoso Central (SNC) de cavalos e outros eqüídeos. A LEME foi descrita no início do século por Bucley e McCallum (1901) e caracterizada por encefalite hemorrágica aguda acometendo os eqüinos de Maryland (EUA). Butler (1902) foi quem confirmou experimentalmente a doença, após a administração oral de milho mofado a eqüinos. Em 1971, Wilson e Maranpot (1971) conseguiram reproduzir experimentalmente a doença através da administração oral a eqüinos de milho contaminado artificialmente com *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb., isolados de cereal envolvido com surto da doença no Egito. A fumonisina também é responsável por ocasionar edema pulmonar e hidrotórax em suínos (HARRISON et al., 1990) e efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos e apoptose (morte celular programada) em fígado de ratos (GELDERBLOM et al., 1988; 1991; 1996; POZZI et al., 2000), sendo também relacionada a muitos surtos ocorridos em vários países (Canadá, Egito, Peru, África do Sul, EUA), confirmando a exposição animal às micotoxinas.

Experimentalmente, as fumonisinas causam efeitos adversos no fígado das aves domésticas e provoca o aumento da incidência de câncer hepático em ratos (DIAZ; BOERMANS, 1994).

No Brasil a doença foi descrita pela primeira vez em São Paulo por Rego (1950), entretanto a relação entre LEME e *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. foi estabelecida por Riet-Correa; Meireles e Soares (1982) quando da descrição de três surtos da toxicose no Rio Grande do Sul.

2.3.4 Produção das Fumonisinas em Alimentos

A incidência de fumonisinas verifica-se mundialmente e é clara a sua presença em alimentos destinados a humanos e animais, dada a incidência destas

micotoxinas no milho, uma vez que cerca de 90% do *F. moniliforme* se encontra no referido cereal. Doenças fatais em animais tem sido associadas principalmente a este tipo de alimento.

Seu efeito tóxico mais importante é o câncer do esôfago relacionado em humanos, sendo o milho mofado o melhor local para o desenvolvimento de fumonisinas. As rações para animais estão também sendo muito associadas a contaminação por esta micotoxina.

2.4 MILHO

O milho (*Zea mays* L) é uma espécie da família das gramíneas, sendo o único cereal nativo do Novo Mundo. É o terceiro cereal mais cultivado no planeta. Este não originário do Brasil, apenas o México e a Guatemala são considerados países que deram origem ao milho que conhecemos hoje. Consumido pelos povos americanos desde o ano cinco mil a.C., o milho foi a alimentação básica de várias civilizações importantes ao longo dos séculos. Os Maias, Astecas e Incas reverenciavam o cereal na arte e religião e grande parte de suas atividades diárias eram ligadas ao seu cultivo. Com a descoberta da América e as grandes navegações do século XVI, a cultura do milho se expandiu para outras partes do mundo (Figura 3). Hoje é cultivado e consumido em todos os continentes e sua produção só perde para a do trigo e arroz (ABIMILHO, 2002).

Muito energético, o milho traz em sua composição vitaminas A e do complexo B, proteínas, gorduras, carboidratos, cálcio, ferro, fósforo e amido. As cascas dos grãos são ricas em fibras, cada 100 gramas do alimento tem cerca de 360 Kcal, sendo 70,0% de glicídios, 10,0% de protídeos e 4,5% de lipídios.

É um dos alimentos mais nutritivos que existem. Puro ou como ingredientes de outros produtos, é uma importante fonte de energética para o homem. Ao contrário do trigo e o arroz, que são refinados durante seus processos de industrialização, o milho conserva sua casca, que é rica em fibras, fundamental para a eliminação das toxinas do organismo humano (ABIMILHO, 2002).

Maior que as qualidades nutricionais do milho, só mesmo sua versatilidade para o aproveitamento na alimentação humana. Ele pode ser consumido diretamente ou como componente para a fabricação de balas, biscoitos, pães,

chocolates, geléias, sorvetes, maionese e até cerveja. Cultivado em todo país, é a matéria prima principal de vários pratos culinários como cuscuz, polenta, angu, bolos, canjicas, mingaus, cremes, entre outros. Além disso, a maior parte de sua produção é utilizada na alimentação animal e chega até nós através dos diversos tipos de carne (bovina, suína, aves e peixes).

Em termos de produção, é atualmente a segunda espécie mais cultivada no mundo, depois do arroz (*Oryza sativa*). Até a safra 98/99 o trigo (*Triticum sativum*) detinha a posição de segundo cereal mais produzido, a partir daí, foi suplantado pelo milho. É o mais expressivo, com cerca de 57,481 milhões de toneladas de grãos produzidos, em uma área de aproximadamente 14,748 milhões de hectares (CONAB, 2008).

Figura 3. Ranking da área colhida de milho no mundo (em mil hectares)

Fonte: Abimilho (2004)

Num país como o Brasil, com imensas áreas cultiváveis e com graves problemas de desnutrição, mais do que simplesmente uma questão comercial, o aumento do consumo de milho por parte da população é antes de tudo uma solução

social. A Tabela 2 mostra a estimativa de consumo de milho no Brasil por segmento (tonelada).

Tabela 2. Milho Brasil: Estimativa de consumo por segmento (toneladas)

Segmento	Consumo						
	2001	2002	2003	2004	2005	2006*	2007**
Avicultura	13.479	14.500	15.427	16.162	19.309	20.022	20.515
Suinocultura	8.587	8.930	8.471	8.852	11.236	11.097	12.022
Pecuaria	2.772	2.841	1.911	2.198	2.520	2.479	2.374
Outros Animais	1.528	1.543	1.550	1.581	615	660	673
Consumo Industrial	4.050	4.090	4.152	4.256	4.044	4.159	4.369
Consumo Humano	1.505	1.514	1.530	1.568	690	700	705
Perdas/Sementes	998	913	1.660	1.429	296	310	349
Exportação	2.550	1.583	3.988	5.000	869	4.327	5.000
Outros	3.622	3.550	4.809	4.132	-	-	-
Total	39.091	39.464	43.498	45.178	39.579	43.754	46.007

Fonte: FNP Consultoria e Safras & Mercado* Projeções: Setembro/2006** Estimativa 2006

2.4.1 Produção Brasileira

A estimativa da safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas, indica uma produção de 142,6 milhões de toneladas, 1,50% maior que a prevista em março (140,5 milhões de toneladas) e 7,20% acima da obtida em 2007 (133,1 milhões de toneladas). Com relação à área plantada em 2007 (46,80 milhões de hectares), acréscimo de 3,20%. Entre os produtos investigados, a soja, o milho e o arroz são os que ocupam as maiores áreas previstas, com respectivamente, 21,20; 14,50 e 2,90 milhões de hectares cultivados em 2008. Estes produtos representam 90,6% da produção nacional estimada de grãos.

O Gráfico 1 apresenta a produção de cereais, bem como a área colhida em hectares.

Gráfico 1. Produção brasileira total de cereais

Fonte: IBGE 2008

A evolução na produção de grãos e na área plantada de 1980 a 2008 aumentou significativamente mais que a área ocupada com outras culturas, atestando os avanços tecnológicos que determinaram um aumento no rendimento médio. A produção de 2003 (123,60 milhões de toneladas) ultrapassou os 100 milhões de toneladas de grãos, um recorde batido em 2007 (133,10 milhões de toneladas) superado em 2008 (142,60 milhões de toneladas). Destacam-se os aumentos, frente ao ano anterior, na produção de arroz, milho (ambas as safras) e soja (IBGE, 2008).

2.4.2 Consumo Humano

O milho se caracteriza por se destinar tanto para o consumo humano como por ser empregado para alimentação de animais. Em ambos os casos, algum tipo de transformação industrial ou na própria fazenda pode ser necessária. A Tabela 3 apresenta os múltiplos usos do milho no Brasil.

A industrialização pode ocorrer através dos processos de moagem úmida e seca. Este último é atividade de longa tradição no Brasil, tendo-se iniciado no passado com a moagem caseira de milho não degerminado para se obter o fubá

integral, passando pelo estágio de pequenos moinhos regionais, até se transformar em setor industrial de destaque com alta tecnologia (SETTI, 1992). Na moagem a seco, os produtos principais são: o fubá comum, a canjica, fubá mimoso ou de canjica, a quirera e os farelos para rações. Todos eles são obtidos do endosperma e só se diferenciam no tamanho da partícula. Como subproduto da produção de canjica resta o germe, destinado às fábricas de óleo (PALOMINO; FONSECA; OETTERER, 1997). Na moagem úmida, os derivados principais são o amido e seus subprodutos. O amido é o produto mais importante, seja para uso direto ou como matéria-prima para um número muito grande de outros derivados. Os subprodutos possuem alto valor comercial: o germe é destinado às fábricas de óleo, a água de maceração é usada nas indústrias de fermentação e de ração, e o glúten e o farelo na preparação de rações (PALOMINO; FONSECA; OETTERER, 1997)

Tabela 3. Os múltiplos uso do Milho (planta, espiga e grão) no Brasil

Destinação	Forma/Produto Final
Uso Animal Direto	Silagem; Rolão; Grãos (inteiro/desintegrado) para aves, suínos e bovinos.
Uso Humano Direto de Preparo Caseiro	Espiga assada ou cozida; Pamonha; Curau; Pipoca; Pães; Bolos; Broas; Cuscuz; Polenta; Angus; Sopas; Farofa.
Indústria de Rações	Rações para aves (corte e postura); outras aves; Suínos; Bovinos (corte e leite); Outros mamíferos.
Indústria de Alimentos Produtos Finais	Amidos; Fubás; Farinhas comuns; Farinha pré-cozidas; Flocadas; Canjicas; Óleo; Creme; Pipocas; Glicose; Dextrose.
Intermediários	Canjicas; Sêmola; Semolina; Moído; Granulado; Farelo de germe.
Xarope de Glucose	Balas duras; Balas mastigáveis; Goma de mascar; Doces em pasta; salsichas; salames; Mortadelas; Hambúrgueres; Outras carnes processadas; Frutas cristalizadas; Compotas; Biscoitos; Xaropes; Sorvetes; Para polimento de arroz.
Xarope de Glucose com alto teor de maltose	Cervejas
Corantes Caramelo	Refrigerantes; Cervejas; Bebidas alcoólicas; Molhos.
Maltodextrinas	Aromas e essências; Sopas desidratadas; Pós para sorvetes; Complexos vitamínicos; Produtos achocolatados.
Amidos Alimentícios	Biscoitos; Melhoradores de farinhas; Pães; Pós para pudins; Fermento em pó; Macarrão; Produtos farmacêuticos; Balas de goma.
Amidos Industriais	Para papel; Papelão ondulado; Adesivos; Fitas Gomadas; Briquetes de carvão; Engomagens de tecidos; Beneficiamento de minérios.
Dextrinas	Adesivos; Tubos e tubetes; Barricas de fibra; lixas; Abrasivos; Sacos de papel; multifolhados; Stampagem de tecidos; Cartonagem; Beneficiamento de minérios.
Pré-Gelatinizados	Fundição de peças de metal.
Adesivos	Rotulagem de garrafas e de latas; Sacos; Tubos e tubetes; Fechamento de caixas de papelão; Colagem de papel; madeira e tecidos.
Ingredientes Protéicos	Rações para bovinos; suínos; aves e cães.

Fonte: Jornal Agroceres (1994)

2.4.3 Consumo Animal

O milho é o principal componente da dieta animal, e combinado com outros ingredientes permite ajustar a formulação de rações específicas para a dieta balanceada de acordo com o tipo e a destinação dos animais. Além das rações, o milho pode ser utilizado na forma de silagem de planta inteira, para uso em bovinos e de grão úmido, para uso, principalmente, em suínos (ABIMILHO, 2004)

Na cadeia produtiva o milho passa a se inserir através da produção de leite, ovos, carne bovina, suína e de aves, sendo este canal por onde os estímulos do

mercado são transmitidos aos agricultores. Mudanças nestas cadeias passam a ser de vital importância como incentivadoras do processo produtivo do milho. Três grandes derivações ocorrem neste item: a produção de silagem, para alimentação de vacas em produção de leite e mais recentemente de gado confinado para engorda no período de inverno; a industrialização do grão de milho em ração; o emprego do grão em mistura com concentrados protéicos para a alimentação de suínos e de aves (ABIMILHO, 2004)

A atividade de produção de milho para silagem tem sofrido forte influência, tanto da necessidade de modernização do setor de pecuária leiteira de Minas Gerais, como do incremento das atividades de confinamento bovino que ocorreram nos últimos anos.

Na industrialização do grão de milho em ração, o processo de transformação é tipicamente industrial, que resulta no fornecimento de rações prontas, principalmente utilizadas na criação de animais de estimação, como cães, gatos, etc.

Na criação de suínos, devido à quantidade relativamente grande de milho necessária, este normalmente é adquirido em grão, ou é parcialmente produzido, pelos criadores para mistura com concentrados na propriedade rural.

Com base em informações da Associação Brasileira das Indústrias do Milho (ABIMILHO, 2004), os pesquisadores apontam que cerca de 80% de todo o milho produzido no Brasil foi consumido sob a forma de ração nos últimos anos, com pouco mais de 10% da produção total sendo destinada para uso industrial e para consumo humano direto, proporção que segue estável desde o início da década de 80. Mais da metade do milho destinado à alimentação animal vai para a criação de suínos e aves, que representam cerca de 30% da disponibilidade total de carnes no país. No período de 2001/02 a 2005/06, a avicultura consumiu, em média, 55% do total de milho destinado à alimentação animal, enquanto a suinocultura 37,10% e a pecuária bovina mais os outros animais apenas 9,30% (PET FOOD, 2009).

2.5 ALIMENTAÇÃO DE ANIMAIS DE COMPANHIA (PET)

Animais de estimação (PETS) são das espécies criadas e mantidas pelo homem para seu entretenimento, sem propósito de fornecimento de produtos ou subprodutos de interesse econômico (BRASIL, 2009).

Nos últimos anos, o segmento de alimentos de animais de estimação no Brasil apresentou um expressivo crescimento no volume de vendas. O mercado brasileiro de rações para cães apresenta os maiores índices de crescimento mundial. De acordo com os dados do Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal, no ano de 2005 foram produzidos 47,20 milhões de toneladas de rações, com o valor estimado em US\$ 9,30 bilhões, e a perspectiva para o segmento é bastante otimista. Ressalta-se que, no caso de fabricante de alimentos para cães, a margem de lucro costuma ser maior que no segmento de animais de grande porte (GIRIO, 2007).

As indústrias de rações para pets têm como objetivo principal proporcionar benefícios nutricionais, estéticos e de desempenho para uma melhor qualidade de vida do animal. Quando formulações de rações são desenvolvidas, o foco é suprir as necessidades de cada espécie animal, respeitando tamanho, idade, raça, sua sensibilidade e outras particularidades pertinentes (GIRIO, 2007).

Na composição dos alimentos estão presentes subprodutos de origem animal, como farinha de carne e de osso, além de produtos agrícolas, que podem apresentar uma variedade de contaminantes, toxinas e agentes patogênicos, provenientes dos ingredientes da própria matéria-prima, principalmente os grãos, que são amplamente utilizados na fabricação deste produto. Outros fatores de risco estão inerentes aos estabelecimentos comerciais, no que se refere ao armazenamento e a oferta do produto para os consumidores (BRITO, 2009).

Essa contaminação pode causar riscos à saúde dos animais, podendo afetar as funções hepáticas, renais, circulatórias, neurológicas, levar a formação de câncer, desencadear sérias infecções e dependendo do grau, ser letal ao animal de estimação, podendo inclusive reduzir a eficácia do tratamento veterinário com antibióticos pela exposição anterior do animal a seus resíduos na ração (PET FOOD, 2009).

Na produção das rações as indústrias devem tomar certos cuidados, desde a escolha da matéria prima, durante o preparo da ração, até o produto final, sempre obedecendo às Boas Práticas de Fabricação (BPF) e realizando periodicamente as Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (PET FOOD, 2009).

Supervisionar cada etapa de produção, evitando perdas ou falhas e mantendo a qualidade do produto, pode ser um grande diferencial para os fabricantes deste tipo de alimento.

2.6 ANÁLISES DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

2.6.1 Amostragem

O objetivo da amostragem é obter porção representativa do lote do grão, com o intuito de indicar sua natureza, qualidade e tipo. Essa amostra deverá ter características similares, em todos os aspectos, às médias do lote do qual foi retirada, pois a quantidade de grãos a ser analisada é em geral, muito pequena em relação ao tamanho do lote que se supõe representar (CASEMG, 2005).

A contaminação de produtos agrícolas com micotoxinas não está presente de maneira uniforme no mesmo lote. Por esta razão existe variação na determinação de micotoxinas de amostra do mesmo lote, fato este que dificulta a concentração atual destas em um mesmo lote (PIEADDE et al., 2002). Pelo fato das partículas contaminadas não serem distribuídas de maneira uniforme por todo o lote, as amostras devem ser resultado de um acúmulo de várias pequenas porções tomadas de diferentes locais por todo o lote.

O procedimento para teste de micotoxinas geralmente consiste de quatro etapas: colheita da amostra, moagem, sub-amostragem da amostra moída e análises (WHITAKER; SLATE; JOHANSON, 2005).

2.6.2 Métodos de análises de micotoxinas em alimentos

Vários métodos têm sido usados para análises de aflatoxinas e fumonisinas. As metodologias analíticas para a determinação de micotoxinas em alimentos geralmente são compostas pelas etapas de extração, limpeza, separação, detecção, quantificação, e confirmação (SCOTT, 1991). As etapas vão diferir dependendo dos equipamentos, reagentes disponíveis e dos requerimentos analíticos (sensibilidade, exatidão, tempo de análise e custo).

O desempenho dos métodos analíticos também pode ser influenciado pela composição química do alimento. Portanto um grande número de métodos para triagem, inspeção e controle de micotoxinas em alimentos tem sido proposto.

2.6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Entre os métodos de análises, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análises, como por exemplo, a espectrofotometria de massa (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre as fases móveis estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. A principal característica da CLAE é a utilização de fases estacionárias com micropartículas (10,5 ou 3,0 μ) esféricas, de preferência. Estas fases, por serem muito menos impermeáveis, tornaram necessária a utilização de bombas para a eluição da fase móvel. A utilização destas novas fases estacionárias, associada ao desenvolvimento de instrumentação, levou esta técnica a um melhor desempenho em termos de resolução, quantificação e detecção em um menor tempo de análise (CASS; DEGANI, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo e Abrangência

A colheita das amostras foi realizada nos municípios de Pirassununga, Porto Ferreira, Leme e Araras, os quais estão localizados na região Nordeste do Estado de São Paulo. Os municípios estão localizados na região central do estado (Figura 4) e encontram-se interligados através da rodovia Anhanguera, distantes cerca de 20 km entre si, e a 160-200 km da cidade de São Paulo. De acordo com o censo efetuado pelo IBGE em 2002, as populações destas quatro cidades atingem cerca de 300.000 habitantes.

Similarmente a outras cidades típicas do interior paulista, a comercialização e o consumo de produtos à base de milho são bastante difundidos, principalmente nas épocas frias do ano. Deste modo, os resultados obtidos no presente trabalho poderão servir de base para estimar também os níveis de ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em alimentos comercializados em outras regiões do interior do Estado de São Paulo.

Figura 4. Localização do município de Pirassununga e respectiva região do Estado de São

3.2 AMOSTRAGEM

3.2.1 Produtos Industrializados à Base de Milho

Durante o estudo, foram analisadas amostras de três tipos de produtos de milho: milho em grão, farinha de milho e fubá pertencentes às quatro marcas de maior volume de comercialização, todas dentro do prazo de validade, nas lojas de supermercados de cada município. Foram colhidas quatro amostras de cada tipo de produto por mês (um de cada marca), totalizando 12 amostras/mês. Assim, foram analisadas 24 amostras de cada tipo de produto ao longo do estudo, durante seis meses, totalizando 72 amostras, sendo 24 amostras de cada cidade (Tabela 4).

Tabela 4. Quantidade de produtos industrializados à base de milho coletados nos municípios de Pirassununga, Porto Ferreira, Leme e Araras

Produtos	Quantidade de marcas coletadas	Período da coleta	Total de amostras
Milho em grão	4	6 meses	24
Farinha de milho	4	6 meses	24
Fubá	4	6 meses	24

A unidade amostral foi constituída por embalagens originais fechadas contendo, no mínimo, 500 g de amostra, sendo que cada uma foi proveniente de um lote de fabricação, conforme indicado no rótulo do produto, evitando-se a colheita de lotes repetidos. A colheita de amostras foi realizada em lojas de supermercados localizados nos municípios de Pirassununga, Porto Ferreira, Leme e Araras. Para isto, estabeleceu-se o número de quatro lojas (um em cada cidade), escolhidas aleatoriamente entre aquelas situadas nos referidos municípios. As quatro lojas de supermercados foram visitadas mensalmente para a colheita de amostras, retirando-as, ao acaso, das unidades disponíveis nas gôndolas.

A colheita foi efetuada na primeira semana de cada mês, repetindo-a seis vezes, de modo a totalizar o número de amostras previsto no estudo. As amostras foram devidamente identificadas e codificadas: Milho em grão (**M**), Farinha de milho (**FM**) e Fubá (**Fb**) incluindo a anotação dos dados do fabricante, lote e/ou data de fabricação e validade, acondicionadas em sacos de polipropileno estéreis e

armazenadas em caixa isotérmica de transporte. A colheita de amostras foi realizada no período de setembro de 2006 a fevereiro de 2007, sendo as amostras enviadas ao Laboratório de Microbiologia e Micotoxologia de Alimentos (LMMA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), em Pirassununga-SP, para a realização imediata das análises.

3.2.2 Milho para fabricação de ração para animais de companhia (PET)

Para a coleta de milho em grão para fabricação de ração animal (PET), foi visitado um armazém rural localizado no município de Porto Ferreira, Estado de São Paulo. Foram colhidas um total de 24 amostras durante o período de março a junho de 2008, sendo duas amostras no mês de março, oito em abril, nove em maio e cinco em junho. As amostras foram coletadas na etapa da recepção, antes de passarem pelos processos de limpeza, secagem e estocagem em silo.

A amostragem de milho em grão foi realizada de acordo com os critérios recomendados pela Food And Agriculture Organization - FAO (1993) e revisados por Fonseca (2002) para as análises de aflatoxinas e fumonisinas. No armazém foram colhidos 16 kg de milho em grão diretamente do caminhão de transporte. O número de pontos amostrados (N) foi definido pela equação $N = 4 \times (\text{raiz quadrada da massa do lote, expresso em toneladas})$. A quantidade de milho colhido em cada ponto (em gramas) foi calculada pela divisão de 10.000 pelo número de pontos definidos na equação anterior. As porções foram colhidas em pontos uniformemente distribuídos ao longo de cada carreta de transporte, sendo colocadas em um mesmo saco de polipropileno estéril, com a finalidade de compor uma única amostra de cada produtor rural, contendo 16 kg de milho em grão.

A colheita foi efetuada na primeira semana de cada mês, repetindo-a 4 vezes, de modo a totalizar o número de amostras previsto no estudo. As amostras foram devidamente identificadas e codificadas: Milho em grão para ração animal (R), e transportadas ao Laboratório de Microbiologia e Micotoxina de Alimentos (LMMA) da FZEA/USP, em Pirassununga/SP. No referido laboratório as diferentes amostras foram homogeneizadas e pesadas, retirando-se 2 kg de cada lote. Posteriormente as amostras foram novamente homogeneizadas e pesou-se 500 g, para a realização imediata das análises.

3.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

3.3.1 Determinação de Aflatoxinas nas Amostras

A determinação de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) nas amostras foi efetuada mediante a utilização dos procedimentos preconizados pela empresa fabricante de colunas de imunoafinidade (Aflatest[®], Vicam) e determinação através de CLAE, conforme descrito resumidamente abaixo:

No laboratório, a amostra (500 g de milho ou ração; 500 g de fubá ou farinha) foi previamente triturada e homogeneizada em um moinho (tamanho de partícula = 14 mesh). Em seguida, a amostra analítica (50 g) foi colocada em um *blender*, juntamente com 5 g de NaCl e 100 mL de metanol-água (80+20). Após a agitação em alta velocidade (um minuto), o extrato foi filtrado em papel de filtro, recolhendo-se 10 mL em um Becker. Foram adicionados, ao extrato, 40 mL de água ultra-purificada (Milli-Q, Millipore), a mistura homogeneizada foi filtrada (filtro de microfibra, 1,50 μ m, Millipore), recolhendo-se 10 mL para passagem através de coluna de imunoafinidade, sendo a mesma adaptada a um *manifold* conectado a um sistema de vácuo (fluxo de um a duas gotas/segundos). Após a eluição da amostra, a coluna foi lavada através da passagem de 10 mL de água Milli-Q. Em seguida, foi passado 1 mL de metanol (grau CLAE), de maneira a eluir as aflatoxinas, recolhendo o eluato em frasco âmbar. O eluato foi diluído com 1 mL de água ultrapurificada, para formar uma solução de metanol-água (50+50), semelhante à fase móvel a utilizada na corrida cromatográfica.

A separação e a quantificação das aflatoxinas foram conduzidas em um sistema de cromatografia líquida (Shimadzu[®]), equipado com detector de fluorescência (excitação: 360 nm e emissão: 440 nm) e coluna Shim-pack CLC-ODS (5 μ m) 4,60 x 250 mm, precedida de pré-coluna Shim-pack (5 μ m) 4 x 10 mm. Foram injetados 20 μ L da amostra filtrada (membrana filtrante PTFE, 0,45 μ m, Millex, Millipore), utilizando-se, como fase móvel, metanol-água (45+55), com fluxo de 1,0 mL/min. A quantificação das aflatoxinas nas amostras foi realizada através da interpolação das áreas dos picos cromatográficos, obtidos nas amostras, na equação de regressão da curva de calibração.

Os padrões de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ (SIGMA-ALDRICH) encontram-se dissolvidos em solução de benzeno-acetonitrila (98+2), devendo ser calibrado

espectrofotometricamente ($\lambda = 350 \text{ nm}$) através da técnica preconizada por Scott (1990), para obtenção da concentração exata das toxinas. Após a calibração, foram transferidos 200 μL de cada padrão para um frasco, evaporado até a secura sob fluxo de nitrogênio e ressuspendido em volume conveniente de metanol grau CLAE, de maneira a obter uma solução de trabalho contendo aproximadamente 1,0 μg AF/mL. Estas soluções foram utilizadas no preparo dos padrões da curva de calibração (concentrações aproximadas de 0,01 $\mu\text{g/mL}$, 0,02 $\mu\text{g/mL}$, 0,05 $\mu\text{g/mL}$ e 0,10 $\mu\text{g/mL}$ de cada toxina), sendo construída através da injeção de 20 μL de cada solução padrão.

As amostras que apresentarem picos com o mesmo tempo de retenção das aflatoxinas foram submetidas à confirmação através do seguinte procedimento: 0,50 mL do extrato foi transferido para outro frasco e evaporado até a secagem sob fluxo de N_2 . Em seguida, foram acrescentados 200 μL de ácido trifluoroacético e 200 μL de *n*-hexano, deixando-se em repouso em banho-maria a 40°C, de acordo com Scott (1990). Após nova secagem sob fluxo de N_2 , o resíduo foi ressuspendido com 1 mL de metanol-água (50+50). Foram injetados 20 μL do extrato derivatizado no sistema CLAE, nas mesmas condições descritas anteriormente, comparando-se os cromatogramas das amostras com os padrões, previamente preparados através do mesmo procedimento acima (SCOTT, 1990)

3.3.2 Determinação de Fumonisinhas nas Amostras

A determinação de fumonisinas (B_1 e B_2) nas amostras também foi efetuada mediante a utilização de colunas de imunoafinidade (Fumonitest[®], Vicam) e determinação através de CLAE (sistema CLAE Shimadzu[®], equipado com detector de fluorescência, excitação: 335 nm e emissão: 440 nm), de acordo com os mesmos procedimentos descritos no item 3.3.1.

O extrato final obtido na coluna de imunoafinidade foi filtrado (membrana filtrante PTFE, 0,45 μm , Millex, Millipore) e evaporado até a secagem sob fluxo de N_2 . Em seguida, o resíduo foi ressuspendido em 100 μL de acetonitrila:água (1:1) e adicionado de 200 μL de reagente *o*-phthaldialdehydo (OPA) constituído por 1 mL de metanol, 40 mg de *o*-phthaldialdehydo, 5 mL tetraborato de sódio 0,1 molar e 50 μL

de 2-mercatohetanol. Essa solução foi misturada sob a proteção da luz e após 2 minutos, 20 µL foram injetados no sistema CLAE, utilizando-se, como fase móvel, acetonitrila-água-ácido acético (50+50+1), com fluxo de 1,0 mL/min. A quantificação das fumonisinas nas amostras foi realizada através da interpolação das áreas dos picos cromatográficos, obtidos nas amostras, na equação de regressão da curva de calibração. Os padrões de FB₁ e FB₂ (SIGMA-ALDRICH) encontram-se dissolvidos em solução de água-acetonitrila (1+1). As soluções de trabalho a utilizadas no preparo da curva de calibração continham concentrações aproximadas de 0,3 µg/mL, 0,60 µg/mL, 1,20 µg/mL, 2,40 µg/mL e 4,80 µg/mL de cada toxina (SCOTT, 1990).

3.3.3 Avaliação do Desempenho dos Métodos Analíticos

Para avaliar a eficiência da metodologia para a determinação de aflatoxinas e fumonisinas, foram realizados ensaios de recuperação, em amostras artificialmente contaminadas com as toxinas. As amostras (um de cada tipo de produto) foram artificialmente contaminadas com as soluções de trabalho, de maneira a obter níveis de contaminação de 2 e 20 µg AFB₁/kg, e 0,05 e 5,00 mg FB₁/kg. As amostras fortificadas foram preparadas em duplicata para cada nível de toxina, e submetidas aos métodos descritos no itens 3.3.1 e 3.3.2, com vistas à obtenção dos percentuais de recuperação e coeficientes de variação dos resultados das análises.

Os resultados obtidos nos ensaios de recuperação serão submetidos a tratamento estatístico, aplicando-se a distribuição “t” de Student (BERQUÓ; SOUZA; GOTLIER, 1981), com aproximação normal, para avaliar as possíveis diferenças entre as médias obtidas e as concentrações reais de micotoxinas nas amostras, adotando-se $\alpha = 0,01$.

3.4 ESTIMATIVA DE CONSUMO DE MILHO E DERIVADOS

A estimativa da ingestão diária provável média (IDP_M) de aflatoxinas e fumonisinas foi calculada baseada nos níveis médios obtidos nas análises laboratoriais. Para estimar a IDP_M de aflatoxinas e fumonisinas pela população urbana dos municípios em estudo, adotou-se o valor de consumo *per capita* anual de 9 g para fubá de milho estimado pelo IBGE (2004) para o Estado de São Paulo. Foi utilizada também, para o cálculo da IDP_M , a estimativa de consumo de milho e derivados em países da América do Sul, feita pela Organização Mundial de Saúde no documento intitulado *GEMS/Food regional diets* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). O valor da ingestão diária média de aflatoxinas e fumonisinas por unidade de peso corpóreo foi expresso em ng/kg p.c./dia, tomando-se por base o peso médio de 70 kg para indivíduos adultos.

3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Observando-se níveis detectáveis de aflatoxinas e fumonisinas nas amostras, foram determinadas as medidas de posição e dispersão (média, variância e desvio padrão) dos resultados obtidos nas análises micotoxicológicas. Os valores de IDP_M de aflatoxinas e fumonisinas nas áreas urbanas e rurais também serão comparados através do teste e confrontados com os dados de outras populações disponíveis na literatura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUTOS INDUSTRIALIZADOS À BASE DE MILHO

Foram realizadas análises para determinação de aflatoxinas e fumonisinas nos produtos industrializados a base de milho: 24 amostras de milho em grão (M), 24 de farinha de milho (FM) e 24 de fubá (Fb) de diferentes marcas comerciais coletadas em diferentes lojas de supermercados dos municípios de Pirassununga,

Porto Ferreira, Leme e Araras, no Estado de São Paulo. Os resultados podem ser observados nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Determinação de Aflatoxinas em produtos industrializados à base de milho

Produto	Amostras Positivas^a	Acima do Limite de Detecção^b	AFB₁ (µg/Kg)^c	AFB₂ (µg/Kg)^c	AFG₁ (µg/Kg)^c	AFG₂ (µg/Kg)^c	Variação (µg/Kg)
Milho	1/24	3/24	2,49 ± 7,69	0,04 ± 0,10	0,53 ± 1,21	0,10 ± 0,20	0,0 - 38,0
Farinha	0/24	1/24	0,74 ± 1,22	0,03 ± 0,06	0,31 ± 0,62	0,23 ± 0,76	0,0 - 4,89
Fubá	0/24	4/24	2,44 ± 2,40	0,12 ± 0,23	0,54 ± 0,77	0,21 ± 0,34	0,0 - 11,48

^a Acima do Limite Permitido pela Legislação (Somatória AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂ = 20 µg/Kg)

^b Limite de Detecção (Somatória AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂ = 5 µg/Kg)

^c Médias ± Desvio padrão de amostras analisadas em duplicadas

Tabela 6. Determinação de Fumonisinias em produtos industrializados à base de milho

Produto	Amostras Positivas^a	FB₁ (µg/Kg)^b	FB₂ (µg/Kg)^b	Variação (µg/Kg)
Milho	15/24	1.420 ± 1.939,0	48,0 ± 81,0	0,0 - 6.204
Farinha	16/24	1.234 ± 1,84	140,0 ± 162,0	1,07 - 6.857
Fubá	16/24	763,0 ± 768,0	158,0 ± 184,0	0,0 - 2.024

^a Acima do limite de detecção (FB₁+FB₂ = 30 µg/Kg)

^b Médias ± Desvio padrão de amostras analisadas em duplicadas

Tabela 7. Determinação de aflatoxinas em produtos industrializados à base de milho por região

Cidades	Milho^a	Farinha^a	Fubá^a
Araras	1/24	0/24	2/24
Leme	1/24	0/24	0/24
Pirassununga	0/24	1/24	1/24
Porto Ferreira	1/24	0/24	1/24

^a Limite de Detecção (Somatória AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂ = 5 µg/Kg)

Tabela 8. Determinação de fumonisinas em produtos industrializados à base de milho por região

Cidades	Milho^a	Farinha^a	Fubá^a
Araras	4/24	4/24	4/24
Leme	4/24	4/24	4/24
Pirassununga	3/24	4/24	4/24
Porto Ferreira	4/24	4/24	4/24

^a Acima do limite de detecção (FB₁+FB₂ = 30 µg/Kg)

Tabela 9. Determinação de aflatoxinas e fumonisinas em produtos industrializados à base de milho por região

Cidades	Milho^{a/b}	Farinha^{a/b}	Fubá^{a/b}
Araras	0/24	0/24	2/24
Leme	1/24	0/24	0/24
Pirassununga	0/24	1/24	1/24
Porto Ferreira	0/24	0/24	1/24

^a Limite de Detecção (Somatória AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂ = 5 µg/Kg)

^b Acima do limite de detecção (FB₁+FB₂ = 30 µg/Kg)

A Tabela 5 apresenta o número de amostra positiva para aflatoxinas e suas concentrações nos produtos avaliados. Foram detectadas aflatoxinas em 65 amostras (90,27%) considerando-se a somatória (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂) com variações de 0,01 µg/kg a 41,74 µg/kg. Das 24 amostras de farinha de milho e fubá, 23 (95,83%) e 20 (83,33%) respectivamente, apresentaram níveis de concentração total de aflatoxinas abaixo de 5 µg/kg e apenas duas amostras de milho (8,33%) e uma de fubá (4,16%) apresentaram-se acima de 5 µg/kg para AFB₁.

As concentrações médias de AFB₁ foram de 2,49 µg/kg nas amostras de milho em grão, 0,74 µg/kg na farinha de milho e 2,44 µg/kg no fubá. O milho em grão é freqüentemente o produto que apresenta maior concentração de aflatoxina, entretanto, no presente trabalho apenas uma amostra (4,16%) apresentou níveis totais acima do permitido pelo Ministério da Saúde 41,74 µg/kg, indicando um alto limite de tolerância. Foram encontrados no milho em grão, níveis de AFB₁ igual a

38,00 µg/kg, e 21 amostras (87,50%) apresentaram níveis de concentração total inferior a 5,00 µg/kg.

Na Tabela 6 estão apresentados o número de amostras positivas e as concentrações de fumonisinas. O procedimento de avaliação do método analítico foi realizado com amostras contendo níveis de 100 e 10.000 µg/kg de FB₁ e FB₂. Os percentuais de recuperação encontrados foram 93,40% e 87,20%, respectivamente. Do total de 72 amostras de produtos à base de milho analisadas, 47 (65,28%) apresentaram níveis de fumonisinas acima dos limites de detecção (30,00 µg/kg). Nas amostras de milho em grão 15 (62,50%) apresentaram-se positivas para FB₁ e 9 (37,50%) para FB₂, farinha de milho, 16 (66,66%) para FB₁ e 12 (50%) para FB₂ e nas amostras de fubá, 15 (62,50%) para FB₁ e 13 (54,16%) para FB₂.

Pode-se observar que oito amostras de milho (33,33%) apresentaram-se positivas (acima do limite de detecção) para FB₁ e FB₂, nas amostras de farinha de milho e fubá 11 (45,83%) e 12 (50%) respectivamente, positivas tanto para FB₁ como para FB₂.

As concentrações médias de FB₁ foram de 1.420 µg/kg nas amostras de milho em grão, 1.234 µg/kg na farinha de milho e 763 µg/kg no fubá. Com relação às concentrações médias de FB₂, os valores foram de 48 µg/kg para o milho em grão, 140 µg/kg para farinha de milho e 158 µg/kg para o fubá. O fubá é freqüentemente o produto de milho que apresenta maior concentração de fumonisina, no entanto, no presente trabalho a farinha de milho apresentou o maior número de amostras contaminadas por FB₁ (66,66%) em níveis de até 6.857 µg/kg.

Das 24 amostras analisadas de milho em grão, farinha de milho e fubá, observou-se que duas amostras de milho em grão (M17 e M18) e uma amostras de fubá (Fb11) eram positivas para aflatoxinas (AFB₁) e fumonisinas (FB₁ + FB₂), dentro dos níveis de detecção (> 5 µg/kg AFB₁ e > 30 µg/kg FB₁ e FB₂).

A Tabela 7 apresenta o número de amostras contaminadas por aflatoxinas, acima do limite de detecção 5 µg/kg (somatória AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂) por região. Os produtos de milho em grão variaram de 5,34 a 41,74 µg/kg, onde apenas a cidade de Pirassununga não apresentou contaminação por esta micotoxina. Nas amostras de farinha de milho, apenas a cidade Pirassununga apresentou contaminação 6,54 µg/kg, para o fubá os resultados variaram de 5,48 a 12,78 µg/kg, e a cidade de Araras apresentou duas amostras contaminadas (8,33%) acima do

limite de detecção (FB11=12,78 µg/kg e FB20=5,63 µg/kg), a cidade de Leme não apresentou nenhuma contaminação para este tipo de produto.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da contaminação de fumonisinas, acima do limite de detecção (30 µg/kg) por região para os produtos industrializados. Foram observados que o milho em grão variou de 431 a 6.495 µg/kg, onde apenas a cidade de Pirassununga apresentou três amostras contaminadas (12,30%) e as demais quatro (16,66%) para tal produto. A farinha de milho variou de 156 a 2.489 µg/kg, o fubá 6, 468 a 7.226 µg/kg, onde todas as cidades apresentaram quatro amostras contaminadas para os dois respectivos produtos.

Na Tabela 9 observou-se que para as amostra de milho em grão duas (8,33%) apresentaram-se positivas tanto para aflatoxina como para fumonisina (M17 e M18), para farinha apenas uma (4,16%) (FM9) e para o fubá três (12,50%) (FB9, FB11 e FB18) apresentaram contaminação simultânea a duas micotoxinas

Figura 5. Cromatograma da amostra industrializada de milho em grão (M16) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 0,01 µg/kg)

Figura 6. Cromatograma da amostra industrializada de milho em grão (M17) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 41,74 $\mu\text{g/kg}$)

Figura 7. Cromatograma da amostra industrializada de milho em grão (M10) contaminada com Fumonisin (Somatória = 5.241 $\mu\text{g/kg}$)

Figura 8. Cromatograma da amostra industrializada de milho em grão (M21) sem contaminação por Fumonisinhas

Figura 9. Cromatograma da amostra industrializada de fubá (FB11) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 12,78 $\mu\text{g/kg}$)

Figura 10. Cromatograma da amostra industrializada de fubá (FB20) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 5,63 $\mu\text{g/kg}$)

Figura 11. Cromatograma da amostra industrializada de fubá (FB19) contaminada com Fumonisin (Somatória = 2.489 $\mu\text{g/kg}$)

Figura 12. Cromatograma da amostra industrializada de fubá (FB22) contaminada com Fumonisin (Somatória = 1,182 $\mu\text{g/kg}$)

Figura 13. Cromatograma da amostra industrializada de farinha de milho (FM16) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 4,09 $\mu\text{g/kg}$)

Figura 14. Cromatograma da amostra industrializada de farinha de milho (FM17) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 4,84 $\mu\text{g/kg}$)

Figura 15. Cromatograma da amostra industrializada de farinha de milho (FM11) contaminada com Fumonisin (Somatória = 7.226 $\mu\text{g/kg}$)

Figura 16. Cromatograma da amostra industrializada de farinha de milho (FM21) contaminada com Fumonisin (Somatória = 2,62 µg/kg)

Os produtos derivados de milho apresentaram uma baixa contaminação por aflatoxinas (4,16%) sendo este resultado parcialmente similar na investigação desta toxina com outros autores, como podemos observar nos trabalhos relatados abaixo. Como a maior parte da produção de milho em grão é destinada ao consumo humano e à produção de ração animal, os trabalhos citados demonstram a ocorrência de riscos à saúde humana e animal, ocasionados pela exposição aos alimentos contaminados com esta toxina.

Com relação ao milho e rações, a ocorrência de aflatoxinas tem sido ocasionalmente reportada. Alguns levantamentos demonstraram níveis elevados de contaminação, entre eles o de Santurio *et al.* (1992), os quais analisaram 328 amostras de milho procedentes de várias regiões do Sul do país e detectaram 28,90% das amostras contaminadas por aflatoxinas, com nível médio de 1.906 µg/kg.

Tendo como objetivo conhecer o grau de contaminação de alimentos consumidos pela população da região sul do Brasil, Maixner *et al* (1996), analisaram 128 amostras de amendoim (110) e milho de pipoca (18), no período de julho de 1994 a agosto de 1996, através do método de CCD. Das amostras analisadas 55 (50%) de amendoim e 10 (55,55%) de pipoca apresentaram-se contaminadas por

aflatoxinas, sendo que 24 (21,81%) amostras de amendoim e quatro (22,22%) milho de pipoca demonstraram índices de contaminação superiores ao permitido. A maior contaminação registrada totaliza 1810,7 ppb de aflatoxinas em amendoim proveniente de Apucarana - PR e 134,40 ppb em pipoca de Ijuí - RS.

Hennigen e Dick (1995) relataram que 35% das amostras de milho analisadas, apresentaram contaminação por aflatoxinas no Estado do Rio Grande do Sul.

Mallmann; Santurio e Dilkin (1997) analisaram 169 amostras de alimentos entre os anos de 1996 e 1997, no Rio Grande do Sul e verificaram a contaminação por fumonisinas em 47,10% das amostras de milho, com concentração média de 8,40 µg/g.

Ao analisar 39 lotes de milho colhidos na safra de 1990 e 1991, provenientes do Estado do Paraná, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Yamaguchi et al. (1992) observou que 97,40% das amostras foram positivas para FB₁ e 4,80% para FB₂. As concentrações das micotoxinas detectadas no milho variaram, conforme a região, de 0,6 a 12,6 µg/g para FB₁ e 0,0 a 10,4 µg/g para FB₂.

Entre janeiro de 2002 e fevereiro de 2003, 121 produtos a base de milho foram coletadas do comércio da cidade de Maringá, Estado do Paraná, para análises de aflatoxinas através do método de Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Foram retiradas do mercado 37 amostras de milho degerminado, 17 de farinha de milho, 10 de farinha em flocos, 26 de fubá, 24 milho de pipoca e sete de milho em grão. Foram detectadas aflatoxinas em apenas três amostras (dois de pipoca e uma de milho em grão) 2,50% na total concentração de AFB₁ + AFB₂, com níveis de concentrações de 10,40 a 59 µg/kg, três amostras (duas de pipoca e uma de milho em grão) 2,50% foram positivas para AFB₁ em concentração que variou de 8 a 59 µg/kg e duas amostras (pipoca e milho em grão) 1,70% positivas para AFB₂ na concentração de 2,40 µg/kg. Apenas uma amostras de pipoca e uma de milho em grão apresentaram resultados positivos para aflatoxinas (SEKIYAMA et al., 2005).

Foram coletadas 123 amostras de produtos alimentícios à base de milho, comercializados nas cidades de Maringá e Marialva, Estado do Paraná, Brasil, para análises de aflatoxinas através das técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA) e CCD. Das amostras analisadas apenas sete (5,70%) apresentaram-se positivas para CCD onde os níveis de concentração total de aflatoxina variaram de 3,30 a 23,90 µg/kg e a média total foi de 0,68 µg/kg. Para a técnica ELISA 16 amostras

apresentaram-se positivas (13%) variando de 4,10 a 13,70 µg/kg e o valor médio de aflatoxina total de 0,78 µg/kg (AMARAL et al, 2006).

Estudo realizado em três municípios do Estado do Paraná (Andirá, Apucarana e Sarandi), realizado por Farias et al. (2000), teve uma porcentagem de grãos de milho contaminados pós-colheita com *A. flavus* de 64% e de *A. parasiticus* de 7%, e a partir de 109 isolados de *A. flavus*, evidenciou-se que 73 isolados sintetizaram aflatoxinas AFB₁ e AFB₂, 20 sintetizaram AFB₁, sete AFB₁ e AFG₁, três AFB₁, AFB₂ e AFG₁ e em seis não foi detectada a síntese de aflatoxina.

Quanto aos derivados de milho, existem poucos estudos disponíveis. Milanez; Atui e Lazzari (1998) analisaram 20 amostras de fubá de milho em São Paulo, das quais 11 foram positivas para AFB₁ em níveis de 2,50 a 7,50 µg/kg. Bittencourt et al. (2005), porém, não encontraram amostras positivas para aflatoxinas em 60 amostras de fubá e farinha de milho comercializadas na cidade de São Paulo.

Contaminação por aflatoxina foi encontrada em 60 das 110 amostras de milho recém-colhido (54,50%) por Machinski Jr et al. (2001) no Estado de São Paulo, com concentrações de aflatoxinas B₁ variando de 6 a 1.600 µg/kg.

Bittencourt et al. (2005) observaram 100% das 60 amostras de fubá e farinha de milho comercializados em São Paulo positivas para FB₁ e FB₂, em níveis que variaram de 0,47 a 15,29 mg/kg, para FB₁, e de 0,12 a 3,94 mg/kg, para FB₂.

Orsi et al. (2000) mostraram a ocorrência natural de fumonisinas em 195 amostras de híbridos de milho no Estado de São Paulo, sendo 90,20% delas positivas para FB₁ e 97,40% para FB₂, sendo que os índices médios de contaminação foram de 9,72 µg/g de FB₁ e 7,67 µg/g de FB₂.

Vinte e três amostras, representando 19 cultivares de milho com diferentes tipos de germoplasma, de endosperma e ciclo vegetativo, foram avaliadas quanto ao teor de fumonisinas em três Estações Experimentais do Instituto Agrônomo (Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga) em São Paulo, Brasil, durante a safra de 1997 e 1998. Todos os cultivares analisados estavam contaminados com fumonisinas em níveis que variaram de 1.63 µg/g a 25.69 µg/g e uma média de 5.61 µg/g FB₁ e de 0.38 µg/g a 8.60 µg/g e uma média de 1.86 µg/g FB₂. Estes níveis tão elevados colocam o milho cultivado no Estado de São Paulo entre os mais contaminados do mundo em termos de fumonisinas (CAMARGOS et al., 2000).

Caldas; Silva e Oliveira (2002) analisaram 366 amostras de milho de pipoca, milho em grão, amendoim e derivados e castanha-do-pará através da técnica de cromatografia de camada delgada, consumidos no Distrito Federal - DF, no período de 1998 a 2001. No período de 1998 a 2000 foram detectadas aflatoxinas em 60 amostras (26,40%) das 227 analisadas. O milho em grão foi o produto com maior incidência de contaminação, correspondendo a 60% das amostras analisadas e o milho para pipoca 13,60%. No ano de 2001, foram avaliadas 139 amostras, sendo 86 amostras de amendoim e derivados, 15 de castanhas e 33 amostras de milho. Não foram detectadas aflatoxinas em amostras de milho neste período. AFB₁ foi encontrada nas amostras positivas analisadas durante todo o período de estudos.

Silva et al. (2005) investigaram a alimentação de alunos em idade escolar, de quatro escolas da rede estadual e particular da cidade de Lavras - MG, supostamente contaminada com micotoxinas. Com relação ao milho, notou-se que o consumo quinzenal é bastante expressivo quando observado nas Escolas A (37,70%), Escola C (37,80%), Escola D (58,80%); somente na Escola B o consumo mensal observado foi de 26,80%. Ressaltou-se que a farinha de milho apresenta um consumo bastante elevado, quando observado o consumo quinzenal nas quatro escolas. Estes resultados conduzem a uma preocupação quanto à presença em frequência relativamente alta pelos escolares deste cereal, somados ao fato de os grãos serem o principal substrato para a síntese de aflatoxinas e conseqüente elevação de risco de ocorrência de patologias humanas (MOREIRA et al., 2003; SANTURIO 1999).

Foram adquiridas 74 amostras de produtos à base de milho do comércio de Recife - PE, durante o período de 1999 a 2001, compreendendo os seguintes tipos: canjica (nove), farinha de milho (10), farinha e flocos de milho pré-cozido (31), fubá (11), milho de pipoca (uma), quirera (seis) e quirera fina (seis), para a determinação de fumonisina através do método de CLAE e aflatoxinas por CCD. Das micotoxinas pesquisadas, a fumonisina FB₁ foi a mais freqüentemente encontrada, ocorrendo em 71 amostras analisadas (95,95%) em concentrações, variando de 20 a 8600 µg/kg. A concentração média de fumonisina B₁ nas amostras analisadas foi 590 µg/kg e, considerando apenas as positivas, a concentração média foi de 615 µg/kg. Entre as amostras positivas, as concentrações mais altas foram encontradas em fubá (média=2700 µg/kg e máximo=8600 µg/kg). Em apenas uma das amostras de fubá

não foi detectada a presença de fumonisina B₁. As menores concentrações médias de FB₁ foram encontradas nas amostras de quirera fina (230 µg/kg), canjica (190 µg/kg), farinha de milho (73 µg/kg) e na única amostra de milho de pipoca (21 µg/kg). Com relação às aflatoxinas, cinco amostras apresentaram resultados positivos para aflatoxina B₁ (canjica, farinha e flocos pré-cozido, quirera (xérem) e quirera fina) com valores máximo de 20 µg/kg e apenas três foram positivas para AFB₂ (farinha e flocos pré-cozido, quirera (xérem) e quirera fina) com valores máximo de 3 µg/kg. Apenas duas amostras ultrapassaram o limite permitido pela legislação para aflatoxinas, farinha e flocos pré-cozido (21,50 µg/kg) e quirera (23,30 µg/kg). Todas as amostras contaminadas com aflatoxinas também apresentaram fumonisina B₁ (KAWASHIMA; SOARES, 2006).

Amorim et al (2000) pesquisaram 264 amostras de milho em grão de vários estados brasileiro e detectaram aflatoxinas em 98% das amostras analisadas.

Segundo Correa et al (2000) das 600 amostras de milho provenientes do Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul, Argentina e Paraguai, 56% estavam contaminadas com aflatoxinas.

Corrêa et al. (2000), encontraram 56% das 600 amostras de milho provenientes do Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul, Argentina e do Paraguai contaminadas com aflatoxinas. Em outro estudo, 98% das 264 amostras de milho em grão de diferentes estados brasileiros estavam contaminados por aflatoxinas (AMORIN et al., 2000). Alta frequência de contaminação (60% das amostras) também foi encontrada por Caldas et al., (2002), apesar do número limitado de amostras analisadas (cinco amostras).

A ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas foi investigada em grãos de milho recém colhidos de quatro diferentes regiões do Brasil, pelo método CLAE. Um total de 200 amostras foi coletado das regiões de Várzea Grande (Mato Grosso - MT); Nova Odessa (São Paulo - SP); Santa Maria (Rio Grande do Sul - RS), e Oliveira do Campinhos (Recôncavo Bahiano, Bahia - BA), sendo 50 amostras de cada região no período de novembro de 2004 a abril de 2005. A contaminação por fumonisina B₁ foi observada em 196 amostras (98%) e a contaminação por FB₁ + FB₂ em 149 amostras (74,50%). Na região do Mato Grosso 92% das amostras estavam contaminadas por FB₁ em uma concentração de 0,015 a 8.44 µg/kg e FB₂ (56%) nas concentrações de 0,02 a 3.03 µg/kg, no Rio Grande do Sul 100% das amostras

analisadas continham níveis de FB₁ que variaram de 0,015 a 6,27 µg/kg e FB₂ (50%) em 0,015 a 1,18 µg/kg, na Bahia 100% das amostras eram positivas para FB₁ (0,015 a 9,42 µg/kg) e 98% para FB₂ em níveis de concentração de 0,12 a 1,31 µg/kg, em SP os índices de concentração para FB₁ foram de 0,091 a 9,67 µg/kg em 100% das amostras analisadas e 94% para FB₂ com variação de 0,017 a 3,16 µg/kg. Em relação a aflatoxinas em Nova Odessa (SP) somente uma amostra (2%) estava contaminada com AFB₁ na concentração de 34,20 µg/kg, em Santa Maria (RS), 7 (14%) estavam contaminadas com AFB₁ e 5 (10%) com AFB₂ nos níveis de 13,70 a 1,393 µg/kg e 5,60 a 55,70 µg/kg respectivamente, uma amostra estava contaminada com AFG₁ (39,20 µg/kg) e AFG₂ (29,70 µg/kg). Em Várzea Grande (MT), 9 (18%) das amostras estavam contaminadas com AFB₁ em níveis de 6,8 a 976,1 µg/kg e duas (4%) com AFB₂ em concentrações de 22,30 a 33,4 µg/kg. Em relação a Oliveira dos Campinhos (BA) 4 (8%) apresentaram contaminações com AFB₁ com níveis de 13,70 a 47,80 µg/kg, nesta região não foram detectadas em nenhuma das amostras coletadas AFB₂ (ROCHA et al, 2009).

Os estudos sobre a ocorrência de fumonisinas em milho e produtos derivados demonstram níveis altos de fumonisinas no grão integral e nos derivados submetidos a um processamento mínimo ou sob condições brandas, como farinha de milho, fubá e canjica, que envolve um processo de moagem. Os derivados altamente processados tais como *cornflakes* e outros cereais matinais, salgadinhos de milho e tortilhas tendem a apresentar níveis não detectáveis ou apenas níveis bem baixos de fumonisinas (BULLERMAN, 1996). Similarmente às aflatoxinas, são poucos os estudos sobre a ocorrência de fumonisinas em derivados à base de milho no Brasil.

No Estado do Paraná e nove no Mato Grosso do Sul e Goiás, Hirooka et al. analisaram 48 amostras de milho, colhidas entre 1990 e 1991. Detectou-se fumonisinas em todas as amostras colhidas no Paraná, com níveis que variavam, de acordo com a região, de 3,25 a 4,79 µg/g de FB₁ e 2,34 a 3,45 µg/g para FB₂. Com exceção de uma amostra proveniente do Estado de Goiás, todas as outras também estavam contaminadas com FB₁ e FB₂ (5,45 e 5,00 µg/g, respectivamente).

Solovey et al (1999), analisaram 37 amostras de produtos a base de milho coletados na Argentina, os resultados demonstraram a ausência de aflatoxina em todos os produtos analisados.

Essas substâncias foram detectadas naturalmente em vários tipos de alimentos, principalmente o milho e derivados, em diversos países, indicando a exposição do homem às micotoxinas em até 3 µg/g. Nos Estados Unidos, Rottinghaus; Coatney e Minor (1992) encontraram concentrações de FB₁ entre 0,1 a 5,0 µg/g em 15% das amostras de milho analisadas.

4.2 MILHO PARA FABRICAÇÃO DE RAÇÃO PARA ANIMAIS DE COMPANHIA (PET)

Foram realizadas análises para a determinação de aflatoxinas e fumonisinas em amostras de milho em grão utilizado para fabricação de ração animal (PET). Um total de 24 amostras foram colhidas de um armazém localizado na cidade de Porto Ferreira, Estado de São Paulo, na etapa da recepção. Os resultados podem ser observados na Tabela 10

Tabela 10. Determinação de aflatoxinas e fumonisinas em milho em grão para fabricação de ração para animais de companhia (PET)

Amostras Positivas	AFB₁ (µg/Kg) ^c	AFB₂ (µg/Kg) ^c	AFG₁ (µg/Kg) ^c	AFG₂ (µg/Kg) ^c	FB₁ (µg/Kg) ^c	FB₂ (µg/Kg) ^c	Variação (µg/Kg)
Aflatoxinas 0/24 ^a	0,21 ± 0,38	0,01 ± 0,03	0,06 ± 0,18	0,14 ± 0,50	Nr	Nr	0,0 - 2,28
Fumonisin 20/24 ^b	Nr	Nr	Nr	Nr	3.275 ± 2.098	1.307 ± 1.478	0,0 - 9.707

^a Acima do Limite Permitido pela Legislação (Somatória AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂ = 50µg/Kg)

^b Acima do limite de detecção (FB₁+FB₂ = 30µg/Kg)

^c Médias ± Desvio padrão de amostras analisadas em duplicadas

Nr: Não realizada

A Tabela 10 apresenta o número de amostras positivas para aflatoxinas e fumonisinas e suas concentrações nos produtos avaliados. Foi detectada aflatoxina em 10 amostras (41,66%) na concentração total (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂) com variações de 0,35 µg/kg a 3,93 µg/kg. Das 24 amostras analisadas 100% apresentaram níveis de concentração total de aflatoxina abaixo de 5 µg/kg, ou seja,

todas as amostras analisadas apresentaram-se dentro do limite estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Portaria MA/SNAD/SFA nº 07, de 09/11/88 - publicada no Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 - Seção I, página 21.968, 1988, relata: para qualquer matéria-prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal: Aflatoxinas (somatória) = 50 µg/kg (ppb), nos USA, Canadá e México o limite estabelecido é de 20 µg/kg e na Europa 10 µg/kg.

As concentrações médias de AFB₁ foram de 0,21 µg/kg, onde os níveis de contaminação variaram de 0,0 a 1,63 µg/kg.

Do total de 24 amostras analisadas para fumonisinas, 20 (83,33%) apresentaram níveis desta toxina acima do limite de detecção (30 µg/kg).

Pode-se observar que 24 amostras apresentaram-se positivas para FB₁ e sua concentração média foi de 3.275 µg/kg, sendo que seus níveis de concentração variaram de 539 a 9.707 µg/kg, já para FB₂ a concentração média foi de 1.307 µg/kg e seus níveis de concentração variaram de 0,0 a 6.672 µg/kg. Verificou-se que 20 amostras (83,33%) eram positivas tanto para FB₁ como FB₂.

Figura 17. Cromatograma da amostra de milho em grão para fabricação de ração animal (R1) contaminada com Aflatoxinas (Somatória = 1,64 µg/kg)

Figura 18. Cromatograma da amostra de milho em grão para fabricação de ração animal (R1) contaminada com Fumonisinás (Somatória = 6.672 $\mu\text{g/kg}$)

Constatou-se uma alta incidência de fumonisinas em amostras de milho para a fabricação de ração, esses resultados evidenciam a necessidade de maiores estudos para que se possa regulamentar a qualidade desse tipo de alimento cada vez mais difundido em nosso país. Atualmente não há nenhum limite estabelecido para animais em relação à fumonisinas estabelecido pela Food and Drug Administration (FDA), por não saber certamente sobre sua dose e efeito. Os níveis recomendados, através de pesquisas revelam que não devem ultrapassar 5 ppm para cavalos, 10 ppm para suínos e 50 ppm para gado (USDA)

A falta de critérios e normas técnicas elaboradas pelos órgãos fiscalizadores do governo federal, para contaminantes de ração destinadas a animais domésticos, principalmente cães, dificultou uma melhor interpretação dos resultados obtidos no presente trabalho.

A alimentação que contem mais de 10 $\mu\text{g/g}$ de FB_1 é considerada tóxica e de alto risco se administrada ao animal. Vários estudos relacionados ao LEME, revelaram que uma alimentação contaminada com níveis de 1 a 126 $\mu\text{g/g}$ de FB_1 demonstram sinais clínicos da doença em cavalos (MALLMANN; SANTURIO; DILKIN, 1999).

A presença de micotoxinas nas matérias-primas, principalmente no milho utilizado para fabricação de ração animal vem sendo pesquisado. O Instituto Biológico, Centro de Sanidade Animal de São Paulo, vem realizando análises de micotoxinas em produtos agrícolas e rações desde a década de 80 e pesquisando o assunto há muito tempo, desde a década de 70. Pesquisadores desta Instituição analisaram no período de 1989 a 1999, 728 amostras, sendo que 131 (18%) apresentaram algum nível de contaminação. Em relação à ração animal de criação doméstica, 338 amostras foram analisadas, equivalendo a 46% do total das análises, das quais 17% apresentaram contaminação por uma ou mais micotoxinas em teores variáveis, com alguns destes valores fora dos limites estabelecidos pela legislação (GONÇALEZ; PINTO; FELÍCIO, 2001).

Martins; Martins e Bernardo (2003) relataram a identificação da determinação de micotoxinas em 60 amostras de alimento seco para animal de estimação, sendo: 20 para cães, 20 para gatos e 20 para os pássaros domésticos (10 para canários e 10 para papagaios) adquiridos em lojas de animais de estimação diferentes. Para a determinação de aflatoxinas, ocratoxinas (OTA), fumonisina e deoxinivalenol (DON) foram utilizadas a técnica de CLAE. Os limites de detecção foram: 1 µg/kg para aflatoxinas, 2 µg/kg para a ocratoxina A, 10 µg/kg para o fumonisina B₁ e 100.0 µg/kg para deoxinivalenol. As aflatoxinas não foram detectadas em nenhuma amostra. A ocratoxina A foi detectado em cinco amostras (8,30%) com os níveis que variam de 2 a 3 µg/kg. Fumonisina B₁ e deoxinivalenol estavam presentes em três amostras (5%) com os níveis que variam de 12 a 24 µg/kg e 100 a 130 µg/kg respectivamente. Estas micotoxinas (OTA, FB1 e DON), foram detectadas apenas em alimentos para cães.

Foram coletadas 54 amostras de rações comerciais secas para cães e gatos (34 para cães e 20 para gatos), produzidas por nove empresas para o isolamento e quantificação de fungos. Em 74% das amostras foi detectada a presença fúngica, onde, além de fungos com micélio estéril e leveduras, 23 gêneros de fungos foram identificados. O gênero *Aspergillus* e a espécie *Aspergillus niger* foram os mais freqüentemente isolados. Vinte por cento dos *A. flavus* isolados produziram aflatoxina B₁, todos os isolados de *A. ochraceus* produziram ocratoxina A e nenhum isolado de *A. niger* foi detectado como produtor de ocratoxina através do método de *screening* utilizado (COPETTI, 2005)

Em um estudo realizado por Andrade e Nascimento (2005) na cidade de Pelotas, RS, sobre a presença de fungos filamentosos em ração para cães comercializadas no varejo, foi verificada a presença de um maior número de fungos (UFC/g) em ração a granel mantida em embalagens abertas. Em todas as amostras examinadas constatou-se a presença dos fungos *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.

Apesar de o presente trabalho constatar baixos níveis de aflatoxinas em amostras de milho para ração animal, existem relatos que mesmo níveis mínimos de micotoxinas podem causar danos aos órgãos dos animais, pelo sinergismo que ocorre entre elas aumentando a sua capacidade de ação nos órgãos alvos como fígado e rins principalmente. Sharma e Márquez (2001) estudaram os níveis de contaminação por aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂ e AFP₁) em 35 rações para cães no México, relatando que AFB₁ foi detectada em 79% das amostras; AFB₂ em 26%; AFG₁ em 63%; AFG₂ em 21%; AFM₁ em 63%; AFM₂ em 89%; AFP₁ em 58% das amostras. Os níveis mais elevados de aflatoxina B₁ foram de 39,70 ng/g de ração.

Maia e Pereira (2002), no Brasil detectou que 12% das rações comerciais destinadas para cães estavam contaminadas com aflatoxinas.

Um artigo da revista New Scientist (1985) afirma que um quarto dos grãos produzidos no mundo está contaminado por micotoxinas. Essa situação está de acordo com os resultados de Santurio (1997), confirmada através de resultados de análises de aflatoxinas, realizadas no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria. De cerca de 15.600 amostras de alimentos destinados principalmente ao consumo animal, 80% do material analisado foi milho, ração animal e amendoim. O milho analisado apresentou 41,90% das amostras contaminadas por aflatoxinas; 36,90% de ração destinada ao consumo animal e 48,80% das amostras de amendoim também estavam contaminadas pelas mesmas micotoxinas. O milho teve uma contaminação média de 22 partes por bilhão (ppb); ração com 17 ppb e amendoim com 286 ppb.

No México, em 2001, aflatoxinas foi detectada em 89% das amostras de ração para cães, com valores médio de 5 µg/kg. Na Venezuela, em 2005, ocorreu um grave problema pela contaminação de aflatoxinas em alimentos para cães e gatos. Esta contaminação causou a morte em diversos animais e a retirada do produto no mercado.

Em um estudo realizado na cidade do México, no período de junho a setembro de 2003, 14 amostras de ração para cães, sendo três seca e 11 úmidas foram coletadas de pet shop para determinação de aflatoxinas. As amostras secas e úmidas para consumo de cães adultos apresentaram médias de 24 µg/kg e 17,5 µg/kg respectivamente e para filhotes médias de 17 ppb seca e 29 µg/kg úmida. Do total de amostras analisadas, seis (42,85%) apresentaram-se acima do limite estabelecido (20 µg/kg) (PEÑA, et al., 2008).

Em 1999, no Estado do Texas, 25 cachorros morreram após consumirem ração contaminada com micotoxinas.

4.3 ESTIMATIVA DE CONSUMO DE MILHO E DERIVADOS

Um dos mais importantes aspectos da análise de risco de substâncias químicas é o estabelecimento do grau de exposição do organismo humano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Com relação aos contaminantes presentes nos alimentos, esta determinação é particularmente difícil, embora seja possível estimá-la, indiretamente, a partir dos dados de consumo dos alimentos contaminados, e dos respectivos níveis médios de ocorrência da substância.

Os métodos de estimativa da exposição de populações a micotoxinas relatados na literatura têm variado quanto aos meios utilizados. As pesquisas têm empregado: a) estimativa da ingestão de alimentos que apresentam risco de contaminação através de dados retirados de levantamentos da dieta nacional dos países; b) aplicação de questionários de frequência de consumo; c) acompanhamento de duplicatas das dietas de um grupo reduzido de pessoas; d) a mensuração do nível de contaminação das micotoxinas em produtos alimentícios ou fluídos corporais (CARVALHO, 2005).

Em uma revisão sobre ingestão de aflatoxinas em países em desenvolvimento, Williams et al. (2004) relataram que os países como Índia, China, Ásia e América Latina Central, apresentem 66% das pessoas, de uma população de cerca de 1,2 bilhões, apresentando alto risco de exposição as micotoxinas, através da ingestão de alimentos contaminados.

Nestas condições, o grau de exposição é medido em termos de Ingestão Diária Provável Média (IDP_M) por unidade de peso corpóreo, sendo geralmente

expressa em ng/kg de peso corpóreo (p.c.)/dia. Na avaliação de risco, a IDP_M é comparada com um valor de Ingestão Diária Tolerável (IDT), estabelecida com base em estudos toxicológicos. Para a AFB_1 , não existe consenso sobre um valor de IDT, tendo em vista sua característica genotóxica. Com relação às fumonisinas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu, em 2003, a IDT provisória de 2,0 $\mu\text{g/kg p.c./dia}$ (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Relativamente à utilização de derivados de milho para fins alimentícios, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2005 mostram que o fubá é considerado o principal produto do milho consumido pela população de baixa renda. A média de aquisição alimentar domiciliar *per capita* diária de fubá de milho no Brasil é de 9,0 g. Esta quantidade varia de 13,7 g para famílias com renda de até 1,5 salários-mínimos a 2,5 g para aquelas com renda superior a 23 salários-mínimos vigente no Brasil.

Segundo Herrman e Younes (1999), a IDP_M é calculada utilizando a concentração média de AFB_1 encontrada nas amostras analisadas multiplicado pela quantidade ingerida diariamente do alimento, dividida pelo peso corpóreo de uma pessoa adulta, ou seja, 70 kg.

Considerando que a concentração média de AFB_1 em fubá neste estudo foi de 2,44 $\mu\text{g/kg}$, e a IDP_M é de 0,31 ng/kg p.c./dia no Brasil, variando de 0,48 ng/kg p.c./dia para famílias de menor renda a 0,09 ng/kg p.c./dia para aquelas com a maior renda. Além disso, nota-se que a quantidade *per capita* adquirida diariamente deste produto também varia de acordo com a região geográfica como demonstrado na Tabela 11, ou seja, a Região Nordeste é a que adquire maior quantidade diária do produto (17 g) enquanto a Região Centro-Oeste é a de menor consumo (2,5 g).

Tabela 11. Avaliação de risco pela exposição à aflatoxina B₁ em fubá nas diversas regiões do Brasil, considerando a aquisição diária deste alimento pela Pesquisa de Orçamentos Familiares do IBGE e o resultado médio de 2,44 µg/kg coletada no município de Pirassununga

<i>Região do Brasil</i>	<i>Aquisição per capita diária de fubá (g)</i>	Ingestão Diária Provável Média (IDP _M) (ng/Kg/ p.c./dia)
Nordeste	17,0	0,60
Sul	7,7	0,27
Sudeste	6,1	0,21
Norte	4,7	0,16
Centro-Oeste	2,5	0,09

Fonte: IBGE (2004)

Ao analisarmos as diferentes regiões do Brasil, verificamos que a IDP_M para a região nordeste seria de 0,60 ng/kg p.c./dia acima da IDT proposta por Kuiper-Goodman (1995). Este dado corrobora no incremento de incidência de carcinoma hepatocelular, portanto, há um risco significativo à saúde pública brasileira decorrente da exposição crônica à AFB₁ pela dieta com alimentos derivados do milho, em especial o fubá.

Os valores obtidos no presente trabalho, são superiores aos obtidos por Amaral et al., (2006), onde os pesquisadores obtiveram IDP_M de AFB₁ para amostras de fubá igual a 0,14 ng/kg p.c./dia, varindo de 0,21 ng/kg p.c./dia para famílias de menor renda a 0,04 ng/kg p.c./dia para as de maior renda.

A concentração média de fumonisina B₁ encontrada em amostras de fubá foi de 763 µg/kg, sendo a IDP_M de 98,10 ng/kg p.c./dia no Brasil. Este valor supera a IDT de 2 µg/kg p.c./dia, estabelecida pela OMS (2003), evidenciando o risco a saúde humana, favorecendo o desenvolvimento de câncer renal.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostram que a frequência de aflatoxina em produtos a base de milho comercializados, na região de Pirassununga é baixa. Portanto, a ocorrência de aflatoxina em 1,38% demonstra um alto nível de tolerância, comprovando a importância de ações preventivas para evitar riscos aos consumidores. É necessário ter uma ação vigilante e ativa garantindo assim a segurança alimentar.

A alta ocorrência de fumonisinas em produtos comerciais a base de milho é preocupante, aumentando a exposição humana a estas toxinas. Contudo, estes resultados evidenciam a necessidade de legislação específica e prevenção do desenvolvimento fúngico em todas as etapas de fabricação do produto, bem como durante a colheita e armazenagem do grão.

Apesar da baixa ocorrência de aflatoxinas em milho para fabricação de ração animal (PET) deve-se porém, ressaltar a necessidade de um maior controle do produto para evitar a contaminação por fumonisinas, onde os níveis de contaminação demonstraram-se altos, principalmente em FB₁. A exposição animal a essas micotoxinas, desencadeiam sérios problemas de saúde, independentemente dos níveis de concentração das toxinas.

A Ingestão Diária Provável Média (IDP_M) apresentou uma alta incidência para aflatoxina e fumonisina. O consumo de produtos à base de milho oferece riscos à saúde da população brasileira devido a presença destas toxinas, sendo portanto necessário implantar um programa de monitoramento, principalmente para a população de baixa renda e da região Nordeste, onde existe um consumo maior destes produtos, em especial o fubá, afim de prevenir a incidência de câncer hepatocelular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABIMILHO. Associação brasileira das indústrias do milho. **Milho e suas riquezas - o cereal que enriquece a alimentação humana.** <http://www.abimilho.com.br/ocereal.htm>. Acesso em 01 dez., 2009.

AH-SEO, J.; WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p. 1331-1334, 1999.

AMARAL, K.A.S.; NASCIMENTO, G.B.; SEKIYAMA, B.L.; JANEIRO, V.; JUNIOR, M.M. Aflatoxinas Em Produtos À Base De Milho Comercializados No Brasil E Riscos Para A Saúde Humana. **Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.

AMORIM, S.S.; SILVA, C.M.G.; PIRES, R.A.; SANTOS, E.A.; CASTRO, L.; SÁ, T.A. Occurrence of mycotoxins in food and feed in Brazil. In: **Official Program and Abstract Book of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin**; 2000; São Paulo. p. 141.

ANDRADE, R.M.; NASCIMENTO, J.S. Presença de fungos filamentosos em ração para cães comercializadas na cidade de Pelotas - RS. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 10-12, 2005.

BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**. São Paulo, EPU, 1981.

BETINA, V. **Mycotoxins**: production, isolation, separation, and purification. Amsterdam: Elsevier, 1984. 528 p.

BEUCHAT, L. R. Traditional fermented food products. In: BEUCHAT, L. R (Ed.). **Food and beverage mycology**. Westport: AVI, 1978. p. 224-253.

BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLOM, W. C. A.; GORST-ALLMAN, C. P.; HORAK, R. M.; MARASAS, W. F. O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of Chemistry of the Society of Chemical Community**, v. 1988, p. 743-745, 1988.

BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.

BITTENCOURT, A.B.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 16, p. 117-120, 2005.

BRADBURN, N.; COKER, R.D. Aflatoxin contamination in maize. **Trop. Sci.**, v.33, n.44, p.418-428, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002. Estabelece limites de tolerância para aflatoxinas em amendoim, milho e derivados. **Diário Oficial da União**, Seção I, Brasília, 16 de outubro de 2002.

BRASIL. MAPA. Portaria nº 3, de 22/01/2009. **DOU**, DF, 23/01/2009. Seção 1, p.12.

BRERA, C.; MIRAGLIA, M.; COLATOSTI, M. Evalution of the impact of mycotoxins on human health: Sources of erros. **Microchemical Journal**, v. 59, n. 1, p. 45-49, 1998.

BRITO, Cleusa. **Efeito de diferentes níveis de umidade com e sem utilização de antifúngico em dietas para cães**. Curitiba, 2009, 63f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná.

BUCKLEY, S.S., MAcCALLUM, W.G. Acute hemorrhagii encephalitis prevalent among horses in Maryland. **Am Vet Rev**, v.25, p.99-101, 1901.

BULLERMAN, L.B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: JACKSON L.S.; DE VRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B. **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, 1996. p. 27-38.

BURGUERA, J.A. Presence of aflatoxin B1 in human liver referred to as Reye's Sybdrome in Venezuela. **Acta cient. Venez**; v. 37, n. 3, p. 325, 1986.

BUSBY, W.F.; WOGAN, G.N. Aflatoxins. In: SEARLE, C.E., ed. **Chemical carcinogens**. Washington, American Chemical Society, v.2, p. 945-1136, 1984.

BUTLER, T. Notes on a feeding experiment to produce leucoencephalitis in a horses with positive results. **Am Vet Rev**, v.26, p.748-751, 1902.

BUTLER, W.H. Aflatoxins. In: PURCHASE, I.F.H. (Ed.). **Mycotoxins**, Elsevier, 1974, p. 1-28.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. A. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CAMARGOS, S.M.; SOARES, L.M.V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. **Rev. Brazilian Journal of Microbiology**, v. 3, p. 226-229, 2000.

CARVALHO, Ana Paula Pereira. **Aflatoxinas: ocorrência, ingestão e estimativa de ingestão através de produtos de amendoim na cidade de Piracicaba - São Paulo**. Piracicaba. 2005. 101p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior "Luiz de Queiroz". Universidade São Paulo.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos < Estratégia e Validação**. Editora Eduscar. 2001, 77p.

CASTRO, M.F.P.M., SOARES, L.M.V., FURLANI, R.P.Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (zea mays L.): A preliminary study. **Rev. Microbiol**, v.26, p.289-295, 1995.

COLE, R.J.; COX, R.M. In: **Handbook of Toxic Fungal Metabolites**. New York: Academic Press, 937p., 1981.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Princípios básicos da cromatografia**. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. 6 ed. Campinas: Unicamp, 1995, p. 13-19.

COMPANHIA DE ARMAZENS E SILOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS. http://www.casemg.com.br/serviços/armazém_conv.html>. Acesso em 01 dez., 2009.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 01 dez., 2009.

COPETT, Marina. **Avaliação micológica de rações comerciais para cães e gatos**

e potencial micotoxinogênico de espécies selecionadas. Porto Alegre. 2005. 68 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do rio Grande do Sul.

CORRÊA TBS, RODRIGUES HR, VARGAS EA, ASSAD ED, PRADO G, COSTA PP. Evaluation of the incidence of mycotoxins in Brazilian maize. In: **Official Program and Abstract Book of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin**; 2000; São Paulo. p. 134.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P. & Salunkhe, D.K., Eds. **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton, CRC Press, 1991. p.103-43.

COULOMBE Jr., R. A. Biological action of mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 880-891, 1993.

CHU, F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potencial and preventive measures. **Mutat. Res.**, v. 259, p. 291-306, 1991.

DIAZ, G.J.; BOERMANS, H.J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Vet. Human Toxicol.**, v. 36, p. 548-55, 1994.

DAWSON, R. J. A global view of the mycotoxin problem. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE FUNGI AND MYCOTOXINS IN STORED PRODUCTS, 1991. Bangkok. **Proceedings...** Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1991. p. 22-28.

DOERR, J.A.; HAMILTON, P.B. Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v.62, p.1971-1977, 1983.

ELLIS, W.O.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K. Aflatoxin in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.30, n.4, p.403-439, 1991.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 1997. **World regulations for mycotoxins. A compendium.** FAO Food and Nutrition Paper 64, Rome, 1995

FAO. RELATÓRIO FINAL. Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidade do Alimentos em África. 3-6 de Outubro de 2005. Harare, Zimbábue. ORGANIZAÇÃO

DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E A ALIMENTAÇÃO, Roma, FAO, 2006.

FARIAS, A.X.; ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M.; ANDERSEN, P.M.; CORRÊA, T.B.S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.3, p.617-621, 2000.

FNP. <http://www.fnp.com.br>. Acesso em 01 dez., 2009.

FONSECA, H. **Envenenamento Alimentar - Micotoxinas e Micotoxicoses**. In: Tecnologia dos produtos agropecuários - Alimentos. Nobel, São Paulo. p. 51-57, 1984.

FONSECA, H. **Pequeno histórico das micotoxinas no mundo e no Brasil**. In: MOLIM, R. & VALENTINI, M. L. Simpósio sobre micotoxinas em grãos. Fundação Cargill/Fundação ABC, São Paulo. 208 p. 1999.

FONSECA, H. Sampling plan for the analysis of aflatoxin in peanuts and corn: an update. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, p. 97-105, 2002.

FONSECA, H. BOLETIM TÉCNICO n.13 - <http://www.micotoxinas.com.br>. O amendoim e a aflatoxina. Acesso em 01 dez., 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn. Rome: Food and Agriculture Organization. (FAO Food and Nutrition paper, 55). 1993.

FRISVAD, J.C; SAMSON, R.A. Filamentous fungi in food and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In: ARORA, D.K; MUKERJII, K.G; MARTH, E.H (Eds.). **Handbook of applied mycology**., Food and feeds. New York, Marcel Dekker Inc., v.3, p.31-68, 1992.

GELDERBLOM, W. C. A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; HORAK, R. M.; VLEGGAAR, R.; KIRCK, N. P. J. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1.806-1.811, 1988.

GELDERBLOM, W. C. A.; JASKIEWICKZ, K.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. **Carcinogenesis**, v.12, p. 1247-1251, 1991.

GELDERBLOM, W.C.A.; MARASAS, W.F.O.; VLEGGAAR, R.; THIEL, P.G., CAWOOD, M.E. Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. **Micopathologia**, v.117, p. 11-16, 1992.

GELDERBLOM, W. C. A.; SMUTS, C. M.; ABEL, S.; SNYMAN, S. D.; CAWOOD, M. E.; VAN DER WESTHUIZEN, L.; SWANEVELDER, S. Effect of fumonisin B1 on protein and lipid synthesis in primary rat hepatocytes. **Food Chemistry Toxicology**, v. 34, p. 361-369, 1996.

GIRIO, Taís. **Qualidade microbiológica de rações para cães comercializadas no varejo em embalagem fechada e a granel**. Jaboticabal, 2007, 45f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias. Universidade Estadual Paulista.
GONÇALEZ, E.; PINTO, M.M.; FELÍCIO, J.D. Análise de micotoxinas no instituto biológico de 1989 a 1999. **Rev. Biológico**, São Paulo, v. 63, n.1/2, p.15-19, 2001.

HARRIS, C.C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for de 1990s. **Cancer Research**, v. 51, p. 5023-5044, 1991.

HARRISON, L. R.; COLVIN, B. M.; GREENE, J. T.; NEWMAN, L. E.; COLE, J. R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 217-221, 1990.

HERRMAN, J.L.; YOUNES, M. Background to the ADI/TDI/PTWI. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 30, p. S109-S113, 1999.

HIROOKA, E. Y.; SHIBATA, M. M.; VIOTTI, N. M. A.; CARVALHO, L.; TAKAHASHI, L. S. A.; SOUZA, I. F.; POPPER, I. O. P.; MARASAS, W. F. O. Fumonisin: importância da nova micotoxina de *Fusarium moniliforme* em intoxicações animais no Norte do Paraná. **Revista de Microbiologia**, v. 22, p. 312, 1991.

HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M. Micotoxinas e metabólitos bioativos de *Fusarium*: perspectiva de sua importância para o Brasil. **Semina Ciências Agrárias**, v.15, p. 74-79, 1994.

HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Addit. Contam.**, 13: 173-183, 1996.

HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, set., p. 101-134, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003**. São Paulo, IBGE, 2004. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estudo nacional de despesa familiar**. São Paulo, IBGE, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de produção brasileira de cereais**. São Paulo, IBGE, 2008

JAIMEZ, J.; FENTE, C.A.; VAZQUEZ, B.I.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G. PROGNON, P. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of chromatography a**. v. 882, p. 1-10, 2000.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety Evaluation of certain Food Additives and Contaminants**. Geneva: World Health Organization, 1995.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety Evaluation of certain Food Additives and Contaminants - Aflatoxins**. Geneva: World Health Organization, 1998.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety Evaluation of certain Food Additives and Contaminants - Aflatoxins**. Geneva: World Health Organization; Fifty-sixth meeting, 2001.

JELINEK, C. F. Distribution of mycotoxins in analysis of world wide commodities data, including data from FAO/WHO/UNEP food contamination monitoring programme. **International Conference on Mycotoxins**, Bangkok. 49 p., 1988.

KAWASHIMA, L.M.; SOARES, L.M.V. Incidência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

KUIPER-GOODMAN, T. Mycotoxins: risk assessment and legislation. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 853-859, 1995.

LAZZARI, F.A. **Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, Grãos e Rações**, Curitiba: Ed do autor, 1993.

LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph, University Books, 1995, 352p.

LEESON, S.; SUMMERS, J.D. Some nutritional implications of leg problems in poultry. **Br. Vet. J.**, v.44, n.1, p.81-92, 1988.

LI, Y. C.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; FRITSCHKE, K. L.; ROTTINGHAUS, G. E. The individual and combined effects of fumonisin B₁ and moniliformin on performance and selected immune parameters in turkey poult. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 871-878, 2000.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.131-139, 2007

MAIA, P.P.; PEREIRA, B. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in some Brazilian pet foods. **Food Addit. Contm.**, v. 19, n. 12, p. 1180 -1183, 2002.

MAIXNER, A.E.; SILVEIRA, S.M.; POZZOBON, M.C.; SCHNEIDER, L.G.; FONTANA, F.Z.; MONTAGNER, S.T.; GOULART, K.; ALMEIDA, C.A.; BALDISSERA, M.A.; SANTURIO, J.M.; MALLMANN, C.A. Incidência de aflatoxina em milho de pipoca e amendoim ou derivados utilizados na alimentação humana. In: **III JORNADA INTEGRADA DE PESQUISA EXTENSÃO E ENSINO**, 1996, Santa Maria.

MALLMANN CA, SANTURIO JM, WENTZ I. Aflatoxinas - Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Rev. Ciência Rural**, Santa Maria. v. 24, n. 3, p. 635-43, 1994.

MALLMANN, C.; SANTURIO, J.M.; DILKIN P. Incidência de fumonisina B₁ em milho e rações no Brasil. In: **Congresso Latino Americano de Micotoxicologia** 1997; Maracay, Venezuela; 1997. p.73.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; DILKIN, P. Equine leukoencephalomalacia associated with ingestion of corn contaminated with fumonisin B₁. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 249-252, 1999.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; ALMEIDA, C.A.A.; DILKIN, P. Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arq. Inst Biol.**, v. 68, p. 41-45. 2001.

MANNON, J.; JOHNSON, E. Fungi down on the farm. **New Scientist**, 1985

MARTINS, M.L.; MARTINS, H.M.; BERNARDO, F. Flora fúngica e pesquisa de micotoxinas em alimentos para animais de companhia. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n. 548, p. 179-183, 2003.

MILANEZ, T.V.; ATUI, M.B.; LAZZARI, F.A. Comparação entre imunoensaio e cromatografia em camada delgada na determinação de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em amostras de milho em grão e fubá. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 57, p. 65-71, 1998.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **J. STORED PROD. RES.**, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PORTARIA MA/SNAD/SFA Nº 07, DE 09/11/88 - PUBLICADA NO DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO DE 09 DE NOVEMBRO DE 1988 - SEÇÃO I, PÁGINA 21.968, 1988

MOREIRA, A. N.; RODRIGUES, K. L.; KAEFER, R. I.; MARQUES, A. P.; TEIXEIRA, L. S.; RODRIGUES, M. J.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Aflatoxinas, contaminação fúngica e teor de umidade em produtos utilizados como fonte de fibra alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104/105, p. 94-96, 2003

MOSS, M.O. Recent studies of mycotoxins. **J. Applied Microbiol. Symposium**, v. 84, p. 62S-76S, 1998.

MUSSER, S. M.; PLATTENER, R. D. Fumonisin composition in culture of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1.169-1.173, 1997.

OLIVEIRA, C. A. F; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 417-424, 1997.

OGIDO, Rony. **Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B₁ e fumonisina B₁ em codornas: avaliação de parâmetros de desempenho e qualidade dos ovos**. Pirassununga, 2003, 103f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo.

OPAS. **Micotoxinas**. Criterios de Salud Ambiental, 11. Whashington, 1983, 131p.

ORSI, R.P.B., CORREA, B., POZZI, C.R. Microbiota fúngica em três híbridos de milho recém-colhidos e armazenados.In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO "SAFRINHA", 3, 1995, Assis, SP. **Anais**: Assis : n.i., 1995. v.3. 32p.

ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; POZZI, C.R.; SCHAMMASS, E.; NOGUEIRA, J.R.; DIAS, S.M.C.; MALOZZI, M. Mycoflora and occurrence of fumonisin in freshly harvested and stored hybrid mayze. **J. Stored Prod. Res.**, v. 36, p. 75-87, 2000.

OSBORNE B.G. Mycotoxins and the Cereal Industry - A Review. **Journal of Food Technology**, v. 17, p. 1-9, 1982.

OSWEILER, G. D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, v. 85, n. 1, p. 89-94, 1990.

PALOMINO, M.E.T.; FONSECA, H.; OETTERER, M. Contaminação e distribuição de aflatoxinas nos produtos e subprodutos do processamento via seca e via úmida do milho. **Boletim SBCTA**, v. 31, p. 77-86, 1997.

PEÑA, B.S.D.; VAZQUEZ, B.D.; CÓRDOVA, I.A.; CÓRDOVA, J.C.A; CÓRDOVA, J.M.S. Determination of aflatoxins in commercial dog foods by immunoaffinity column. **Research Journal of biological Sciences**, v. 3, n. 7, p. 772-774, 2008

PERREIRA, M.M.G.;CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e Produção de Aflatoxinas *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 1, 2002.

PET FOOD BRASIL. Ano 1, Edição 2, maio - junho 2009. <http://www.editoraestilo.com.br>. Acesso em 28 set., 2009.

PIEIDADE, F.S.; FONSECA, H.; GLÓRIA, E.M.; DOMINGUES, M.A.C.; PIEIDADE, S.M.S.; BARBIN, D. Distribution of aflatoxins in corn fraction visually segregated for defects. **Brazilian journal of microbiology**, n.33, p. 250-254, 2002.

PITT J.L; HOCKING AD. Fungi and food spoilage. London: Blackie Academic & Professional. 175, 1997.

POZZI, C.R. **Efeitos da administração oral prolongada de fumonisina B₁ e aflatoxina B₁ em ratos (*Rattus norvegicus*)**. São Paulo, 2000. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; ARCARO JÚNIOR, I. A.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.

PRADO, G. Incidência de aflatoxina B₁ em alimentos. **Rev. Farm. Bioq.** v. 5, p. 147-157, 1983.

RAISUDDIN, S. Toxic responses to aflatoxins in a developing host. **Journal of Toxicology: Toxin Review**, v. 12, p. 175-201, 1993.

REGO, C.L. Doença de sintomatologia nervosa causada por intoxicação pelo milho. **Rev. Mil Remonta Vet**, v.10, p.199- 215, 1950.

RIET-CORREA, F., MEIRELES, M.C.A., SOARES, J.M. Leucoencefalomalácia em eqüinos associada à ingestão de milho mofado. **Pesq Vet Bras**, v.2, p.27-30, 1982.

ROCHA, L.O.; NAKAI, V.K.; BRAGHINI, R.; REIS, T.A.; KOBASHIGAWA, E.; CORRÊA, B. Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. **Rev. Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, p. 5090-5103, 2009.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.1-11, 2002.

ROTHSCHILD, L.J. *IARC classes AFB₁ as class 1 human carcinogen*. **Food Chem. News**, v. 34, p. 62-66, 1992.

ROTTINGHAUS, G.E; COATNEY, C.G; MINOR, H.C. A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 326-330, 1992.

SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A.; INOMATA, E.I.; ICHIKAWA, A.H.; GIANNATTASIO, C.M.P. Ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 48, p. 81-5, 1988.

SABINO, M. Micotoxinas em Alimentos. In: OGA, S. (Ed.), **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 1996, p.461-472.

SANTIN, E. Micotoxicoses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. (Eds.). **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p.379-388

SANTURIO, J.M.; BALDISSERA, M.A.; ALMEIDA, C.A.A.; AHMAD, S.H.E.; PRANKE, D.H.L.; HEINRICHS, C.M.; ZANANDREA, S. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinadas ao consumo animal no sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7., 1992, São Paulo, SP. **Anais**. São Paulo, SP: 1992. p.14.

SANTURIO, J. M.; MALLMAN, C. A.; ROSA, A.; APPEL, G. H.; DAGEFORDE, S.; BOOTTCHER, M. Effect of sodium bentonite on the performance and blood parameters of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. **British Poultry Science**, London, v. 40, p. 115-119, 1999

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; CHIANINI, F.; MAJÓ, N.; DOMINGUEZ, J.; DARWICH, L.; MATEU, E. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. **Vet. Microbiol.**, v. 98, p. 151-158, 2004.

SCOTT, P.M. Natural poisons. In: Helrich, K. (Ed). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC); 1990. p.1184-213.

SCOTT, P.M. Methods of analysis for mycotoxins - an overview. In: ROSSEL, J.B.; PRITCHARD, J.L.R. (Eds.). **Analysis of oilseeds, fat and fatty foods**. Elsevier, 141-184, 1991.

SCOTT, P.M. Fumonisin. **Inst. J Microbiol**, v.18, p.257-270, 1993.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos-curso teórico-prático**, Florianópolis, 1996.

SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998, 144p.

SEKIYAMA, B.L.; RIBEIRO, A.B.; MACHINSKI, P.A.; JÚNIOR, M.M. Aflatoxins, ochratoxin a and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 36, p. 289-294, 2005.

SETTI, T. Industrialização do milho no Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DO MILHO E SORGO. **Conferências**. Porto Alegre, SAA, 1992. p.176-185.

SHARMA, M.; MÁRQUEZ, C. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. **Anim. Feed. Sci. Technol.**, v.93, p. 109-114, 2001.

SILVA, R.A.; CHALFOUN, S.M; SILVA, M.A.M.; PEREIRA, M.C. Inquérito sobre o consumo de alimentos possíveis de contaminação por micotoxinas na ingesta alimentar de escolares da cidade de Lavras, MG. **Ciência Agrotec.**, v. 31, n. 2, mar./abr., p. 439-447, 2007.

SMITH, J.E; ROSS, I.C. The toxigenic *Aspergilli*. In: Smith, J.E; Henderson, R.S. (Ed.). **Mycotoxins and animal foods**. London: CRC Press, 1991. p. 31-61.

SMITH, T.K., SEDDON, I.R. Synergism demonstrated between *Fusarium* mycotoxins. **Feedstuffs**, jun., p.12-17, 1998.

SOARES L.M.V; FURLANI R.P.Z. Survey of mycotoxins in wheat and wheat products sold in health food store of the city of Campinas, state of São Paulo. **Rev. Microbiol**, v. 27, n. 1, p. 41-44, 1996.

SOLOVEY, M.M.; SOMOZA, C.; CANO, G.; PACIN, A.; RESNIK, S. A survey of fumonisins, deoxyvalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina. **Food Addit. Contam.**, v. 16, n. 8, p. 325-329, 1999.

SYDENHAM, E.W.; GELDERBLOM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Evidence for the natural occurrence of Fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 38, p. 285-290, 1990.

SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; STOCKENSTROM, S. Fumonisin contamination of commercial corn-based human food stuffs. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 39, p. 2.014-2.018, 1991.

SYLOS, C.M. Ocorrência de micotoxinas em alimentos brasileiros. Depto. de Alimentos e Nutrição - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista - Araraquara, 1994.

TEIXEIRA, Alessandra. **Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de Aflatoxina em Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) através da Cromatografia Líquida de Alta**

Eficiência. Serodopéia, 2008, 57f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn human and animal health. **Mycopathol**, v.117, p.3-9, 1992.

UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S.D.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S.Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvest in Haimen, China by HPLC and Elisa. **Food Chem. Toxicol.**, v. 35, p. 1143-1150, 1997.

VAN EGMOND, H.P. Aflatoxin M₁: occurrence, toxicity, regulation. In: Van EGMOND, H.P. (Ed.). **Mycotoxins in dairy products**. New York: Elsevier Science, 2003. chap. 2, p. 3-39.

WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; RILEY, R.T.; MERRILL Jr., A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **J. Biol. Chem.**, v. 226, p. 1486-1490. 1991.

WHITAKER, T.B.; SLATE, A.B.; JOHNSON, A.S. Sampling feeds for mycotoxins analysis In: DIAZ, D. E. The mycotoxins blue book, Nottingham: **Nottingham University Press**, 2005, p. 1-21.

WILLIAMS, J.H.; PHILLIPS, T.D.; JOLLY, P.E.; STILES, J.K.; JOLLY, C.M; AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: review of toxicology, exposure, potential health consequence, and interventions. **American Journal Clinical Nutrition**, Auburn, v. 80, n. 5, p. 1106-11022, 2004.

WILSON, B.J., MARONPOT, R.R. Causative fungus agent of leukoencephalomalacia in equine animals. **Vet Rec**, v.88, p.484-486, 1971.

WONG, G.J. **Mycotoxins and mycotoxicoses: aflatoxin**. Botany 135: Magical Mushrooms and mystical molds. Honolulu, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of certain mycotoxins in food**. Geneva: World Health Organization. (WHO Technical Report Series, 906). 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **GEMS/Food regional diets**. Geneva, World Health Organization. (WHO Technical Report Series). 2003.

WYATT, R.D. Formas prácticas para disminuir exitosamente las pérdidas por micotoxicosis. I. Aflatoxinas. **Avicultura Profesional**, v.11, n.2, p.64-67, 1993.

YAMAGUCHI, M.M.; HIROOKA, E.Y.; SHIBATA, T.M.M. Fumonisin em milho no Estado do Paraná. In: **Encontro Nacional de Micotoxinas** 1992; São Paulo; 1992. p.27.

YOSHIZAWA, T.; YAMASHITA, A.; LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60: 1626-1629, 1994

ZLOTOWSKI P, CORRÊA AMR, ROZZA DB, DRIEMEIER D, MALLMANN CA, MIGLIAVACCA FA. Surto de aflatoxicose em suínos no Estado do Rio Grande do Sul, **Pesq. Vet. Bras.**, v. 24, n. 4, out./dez, p. 207-10, 2004.