UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ERIKA PELUQUE

VERSÃO CORRIGIDA

Isolamento, identificação molecular e potencial toxigênico de fungos e ocorrência de micotoxinas em misturas de cereais comercializadas no Brasil

Pirassununga

2014

ERIKA PELUQUE

Isolamento, identificação molecular e potencial toxigênico de fungos e ocorrência de micotoxinas em misturas de cereais comercializadas no Brasil

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof$^{a.}$ Dr$^{a.}$ Andrezza Maria Fernandes

Pirassununga

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

P393i

Peluque, Erika
Isolamento, identificação molecular e potencial toxigênico de fungos e ocorrência de micotoxinas em mistura de cereais comercializadas no Brasil / Erika Peluque. -- Pirassununga, 2014.
80 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes.

1. Aflatoxinas 2. Fumonisinas 3. Aspergillus 4. Fusarium 5. HPLC. I. Título.

A minha família que esteve sempre ao meu lado em todas as minhas dificuldades, me apoiando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS pela força dada nos momentos difíceis.

À Prof. Dra. Andrezza Maria Fernandes pela oportunidade, pelos puxões de orelha, ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa pelo suporte dado, pela amizade e companhia até altas horas no laboratório.

Ao Prof. Dr. Carlos Fernandes de Oliveira pelo empréstimo do laboratório.

Ao Prof. Dr. Benedito Corrêa e Tatiana pelo suporte dado em algumas análises.

Às técnicas Flávia e Silvia, que foram de grande valia, pois sem elas não conseguiria concluir o trabalho.

À pós-doutoranda Sabrina, que me ensinou muito nesses dois anos de Mestrado.

Aos grandes amigos que fiz nessa jornada: Anna (cabeção), Euder, Ju Baldin, Marina, Maria Fernanda, Barbara Ferro, Ana Carolina (CEL), Criskely, Bruna Surfs, Andrea, Marcela, Patrícia, Raul (INSU), Evelyn, Ju Navarro e Eurico.

Às grandes amigas de rep. Natália, Lísia e Brenda, que me deram força nessa caminhada e lições para que eu pudesse melhorar, pela grande amizade e por me suportarem a cada dia.

A minha família que me apoiou e me deu força nos momentos difíceis que passei, fazendo com que eu não desistisse no meio do caminho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” (Marthin Luther King)

RESUMO

Peluque, E. **Isolamento, Identificação molecular e potencial toxigênico de fungos e ocorrência de micotoxinas em misturas de cereais denominadas "ração humana" comercializadas no Brasil,** 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

O projeto teve por finalidade isolar e identificar fungos, avaliar o potencial toxigênico dos isolados de *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., detectar e quantificar aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2 e fumonisinas B_1 e B_2 em amostras de misturas de cereais. Foram analisadas 15 marcas de misturas de cereais, prontas para o consumo, adquiridas de supermercados e de empresas que comercializam o produto nacionalmente via internet. Foram adquiridas amostras por sete meses, totalizando 105 amostras ao final do experimento. A contagem de bolores nas amostras variou de $1,0 \times 10^1$ a 2×10^5 unidades formadoras de colônias (UFC)/g, com isolamento de sete cepas de *Aspergillus flavus.* As aflatoxinas B_1 e G_1 foram detectadas em poucas amostras e em baixos níveis, sendo que estes resultados podem ser devidos à baixa atividade de água nos produtos avaliados, a qual foi inferior a 0,63. A fumonisina B_1 foi detectada em 84,8% das amostras, no entanto, a ingestão diária provável calculada para as fumonisinas esteve abaixo da recomendação do JECFA. Apenas uma amostra apresentou níveis de fumonisinas acima do limite esperado para 2016. Adicionalmente, foi observado que 21% das amostras apresentaram mais de um tipo de micotoxina, o que poderia conduzir à potencialização de efeitos tóxicos.

Palavras chave: Aflatoxinas; Fumonisinas; *Aspergillus*; *Fusarium*; HPLC.

ABSTRACT

Peluque, E. **Isolation, Identification and molecular potential toxigenic fungi and mycotoxins in cereal mixtures marketed in Brazil**, 2014. 80 p. MSc. Dissertation - Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2014.

The project aimed to isolate and identify fungi, evaluate the toxigenic potential of isolates of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. detect and quantify aflatoxins B_1, B_2, G_1, G_2 and fumonisins B_1 and B_2 in samples of cereal mixtures. We analyzed 15 brands of cereal mixtures ready to eat adding up to 105 samples at the end of the experiment. Samples were acquired in supermarkets and from companies that market the product nationally by internet. The mold count in the samples ranged from 1.0×10^1 to 2×10^5 colonies forming units (CFU)/ g, with isolation of seven strains of *Aspergillus flavus*. Aflatoxin B_1 and G_1 were detected in a few samples and at low levels, what might be due to the low water activity in the product reviews, which was less than 0.63. Fumonisin B_1 was detected in 84.8% of the samples, however, the probable daily intake calculated for fumonisin was bellow the JECFA recommendation. Only one sample showed fumonisin levels above the expected limit for 2016. Additionally, it was observed that 21% of the samples presented more than one type of mycotoxin, which could lead to enhancement of toxic effects.

Key Words: Aflatoxins, Fumonisins, *Aspergillus*, *Fusarium*; HPLC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química das aflatoxinas 29

Figura 2. Metabolismo da aflatoxina B_1 no fígado 31

Figura 3. Estrutura Molecular das Fumonisinas B_1 e B_2 35

Figura 4. Sequência de análise de aflatoxinas em amostras de misturas de cereais43

Figura 5. Sequência de análise de fumonisinas em amostras de misturas de cereais 46

Figura 6. Caracterização dos ingredientes das 105 amostras adquiridas 48

Figura 7. Colônias de fungos filamentosos de amostra na diluição 10^{-1}, em ágar DG18 50

Figura 8. Frequência, em porcentagem, dos bolores isolados nas amostras 51

Figura 9. Fungo do gênero *Aspergillus* identificado ao microscópio ótico 53

Figura 10. Etapas da análise de potencial toxigênico 54

Figura 11. Alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas obtidas para a região ITS das cepas *Aspergillus flavus* isoladas nesse estudo, realizado com o programa ClustalW versão 1.4 com parâmetros em *default*. 55

Figura 12. Curvas de calibração obtidas para as soluções padrão 57

Figura 13. Cromatograma obtido para o padrão de aflatoxinas contendo 0,1 µg/mL 58

Figura 14. Curvas de calibração obtidas para as cinco soluções padrão 59

Figura 15. Cromatograma obtido para o padrão de FB_1 e FB_2 contendo 500 µg/kg. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados de atividade de água nas amostras das misturas de cereais . 48

Tabela 2. Resultados parciais da contagem de fungos filamentosos nas amostras das misturas de cereais 49

Tabela 3. Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de mistura de cereais. 57

Tabela 4. Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de FB_1 em amostras de mistura de cereais. 60

Tabela 5 – Fumonisinas em amostras de mistura de cereais. 62

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%: Porcentagem

°C: Graus Celsius

µg: Micrograma

µm: Micrômetro

Aa: Atividade de água

AFB_1: Aflatoxina B_1

AFB_2: Aflatoxinas B_2

AFG_1: Aflatoxina G_1

AFG_2: Aflatoxina G_2

AFPA: Aspergillus flavus parasiticus Agar

ANEC: Associação Nacional dos Exportadores de Cereais

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DG18: Ágar Dicloran Glicerol

FIESP: Federação das Indústrias do Estado de São Paulo

g: Grama

HPLC: High performance liquid chromatography

IARC: International Agency for Research on Cancer

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBOPE: Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística

JECFA: Joint Expert Committee Additives

kg: Quilograma

Log: logarítmo

MAPA: Ministério da Agricultura e

Abastecimento mL: Mililitro

nm: Nanômetro

PDIM: Ingestão diária máxima

provável pH: Potencial Hidrogeniônico

ppm: Partes por milhão

RPM: Rotação por minuto

UFC: Unidades formadoras de colônia

UV: Ultra violeta

YES: Agar Yeast Extract Sucrose

SUMÁRIO

RESUMO..... i

ABSTRACT ii

LISTA DE ILUSTRAÇÕES iii

LISTA DE TABELAS iv

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS v

1. INTRODUÇÃO 13

1.1 Objetivos 14

2 REVISÃO DE LITERATURA 15

2.1 Produção de grãos no Brasil 15

2.2 Misturas de cereais 16

2.3 Contaminação fúngica em cereais 18

2.3.1. Fungos do gênero *Aspergillus* 21

2.3.2. Fungos do gênero *Fusarium* 24

2.4 Micotoxinas 26

2.4.1 Aflatoxinas 27

2.4.2 Fumonisinas 33

3 MATERIAL E MÉTODOS 37

3.1 Aquisição das amostras 37

3.2 Atividade de água (Aa) 38

3.3 Avaliação da microbiota fúngica 38

3.4 Sequenciamento do DNA ribossomal das cepas de Aspergillus Seção Flavi isoladas..... 38

3.5 Avaliação do potencial toxigênico das cepas de Aspergillus isoladas 40

3.6 Determinação de aflatoxinas 40

3.7 Determinação de fumonisinas 44
3.7.1 Construção das curvas de calibração para fumonisinas 44
3.7.2 Avaliação do desempenho do método analítico para fumonisinas 44
3.7.3 Detecção e quantificação de fumonisinas 45
3.8 Análise dos resultados 47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
4.1 Caracterização das amostras 47
4.2 Atividade de água (Aa) 48
4.3 Avaliação da microbiota fúngica 49
4.4 Avaliação do potencial toxigênico das cepas de Aspergillus isoladas 53
4.5 Sequenciamento do DNA ribossomal das cepas de Aspergillus Seção Flavi isoladas 55
4.6 Determinação de aflatoxinas 56
4.6.1 Curvas de calibração para aflatoxinas 56
4.6.2 Avaliação do desempenho do método analítico para aflatoxinas 57
4.6.3 Detecção e quantificação de aflatoxinas 58
4.7 Determinação de fumonisinas 59
4.7.1 Construção das curvas de calibração para fumonisinas 59
4.7.2 Avaliação do desempenho do método analítico para fumonisinas 60
4.7.3 Detecção e quantificação de fumonisinas 61
4.8 Ocorrência simultânea de aflatoxinas e fumonisinas nas amostras 65
5 CONCLUSÕES 66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 67

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores e exportadores mundiais de alimentos e fibras, sendo o primeiro no ranking de exportação da soja. Os grãos possuem como características positivas a possibilidade de serem armazenados por um longo período de tempo, sem sofrerem perdas significativas de qualidade. Porém, um armazenamento prolongado sem boas práticas, resulta em grandes prejuízos para o exportador. O Brasil como importante exportador de grãos, tem a necessidade do aperfeiçoamento das técnicas de colheita e armazenagem, para assim ter uma diminuição significativa de contaminação.

Os cereais possuem como característica a susceptibilidade ao ataque de microrganismos, incluindo os fungos. Estes são responsáveis por grande parte dos prejuízos na agricultura. Os fungos são importantes contaminantes de grãos, pois causam alterações indesejáveis nos mesmos, como mudanças na estrutura química e aparência do alimento, fazendo com que este seja recusado.

Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são os principais contaminantes de grãos tanto no campo quanto no armazenamento, bem como possíveis produtores de micotoxinas. As micotoxinas são capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos nos animais e no homem.

A demanda por produtos naturais vem crescendo entre os consumidores que buscam hábitos saudáveis, por possuírem efeitos benéficos à saúde. Assim, pela busca de uma alimentação mais equilibrada e saudável, surge uma série de produtos destinados a esse público-alvo e, dentre esses produtos, está a mistura de cereais.

Por essa crescente procura por alimentos mais saudáveis, surge a necessidade de estudos, para que haja um controle da qualidade desses alimentos destinados ao consumo humano.

1.1 Objetivos

O objetivo geral do trabalho foi isolar e identificar a microbiota fúngica, classificar as espécies de *Aspergillus* por sequenciamento genético, avaliar o potencial toxigênico dos isolados de *Aspergillus* e avaliar a ocorrência de micotoxinas (aflatoxinas e fumonisinas) em misturas de cereais comercializadas em nível nacional, mensalmente, durante o período de sete meses.

Dentre os objetivos específicos, podemos citar:

a) Isolar e identificar fungos nos produtos amostrados e utilizar sequenciamento genético para classificar as espécies de *Aspergillus*;

b) Avaliar o potencial toxigênico dos isolados de *Aspergillus*;

c) Detectar e quantificar aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2;

d) Detectar e quantificar fumonisinas B_1 e B_2;

e) Avaliar a ocorrência simultânea das micotoxinas avaliadas nos produtos amostrados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de grãos no Brasil

De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, o Brasil vem sendo um dos principais produtores e fornecedores mundiais de alimentos e fibras, sendo o primeiro no ranking da exportação de soja (grão, farelo e óleo). No início de 2010, um em cada quatro produtos do agronegócio em circulação mundial foram brasileiros (MAPA, 2013).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) publicou recentemente um estudo sistemático da produção agrícola da safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas do ano de 2011. Esse estudo indicou uma produção de 159,9 milhões de toneladas, superior à safra recorde de 2010, que foi de 149,6 milhões de toneladas. Nesta mesma publicação, há o terceiro prognóstico de área e produção para 2012, com uma estimativa de 160,3 milhões de toneladas, superando a safra de grãos de 2011 (IBGE, 2013).

A distribuição da produção de grãos no ano de 2011 coloca a região Sul como maior produtora nacional, com 67,6 milhões de toneladas, seguida pela região Centro-Oeste com 56,0 milhões de toneladas; Sudeste com 17,2 milhões de toneladas; Nordeste com 14,7 milhões de toneladas e Norte com 4,3 milhões de toneladas (IBGE, 2013).

Devido a esse volume de produção, e sua consequente importância econômica, existe a necessidade premente de promover um melhor desenvolvimento das atividades relacionadas aos grãos e cereais na área de exportação. Para tanto, foi criada a ANEC - Associação Nacional dos Exportadores de Cereais, que fez um levantamento do desempenho das exportações brasileiras de soja em grãos, farelo de soja, óleo de soja e milho em grãos, detalhadas com os

volumes embarcados nos portos desde 2008. No ano de 2011, a ANEC registrou os valores de exportação da soja e seus derivados e do grão de milho. Para a soja em grão o total exportado foi de 32.985.560 toneladas, sendo a China o maior importador com 22.104.719 toneladas; para o farelo de soja um total de 14.166.403 toneladas foram exportadas, sendo a Holanda o país que mais importou, com um total de 3.761.352 toneladas; para o óleo de soja foram exportadas 1.740.960 de toneladas, sendo a China o maior importador: 643.179 toneladas. Para o milho em grão, foram 9.459.144 de toneladas exportadas, sendo o Irã o país que mais importou, cerca de 1.905.670 toneladas (IBGE, 2013).

Os grãos possuem como uma característica positiva, a possibilidade de serem armazenados por longo período de tempo, sem perdas significativas da qualidade.

No entanto, o armazenamento prolongado só pode ser realizado quando se somam práticas corretas de colheita, limpeza, secagem, combate às pragas e prevenção de fungos, a fim de se evitar perdas durante esses processos. Analisando o quadro de exportações acima demonstrado, que coloca o Brasil como um importante exportador mundial de grãos, surge à necessidade de se aliar ao esforço para aumento da produtividade, o aperfeiçoamento das técnicas de colheita e condições de armazenamento, diminuindo as possibilidades de contaminação (EMBRAPA, 2012; COSTA, 2001).

2.2 Misturas de cereais

A demanda por produtos que oferecem uma melhor qualidade de vida tem ganhado espaço entre os consumidores que buscam hábitos mais saudáveis.

Segundo pesquisa realizada pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo

– FIESP e o Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística – IBOP a procura por alimentos saudáveis aumentou em 32% no ano de 2011 (SNA, 2011).

Dentro deste contexto de busca por uma alimentação mais equilibrada e saudável, surge uma série de produtos destinados a esse público-alvo, dentre esses produtos está a mistura de cereais, que basicamente é constituída por extrato de soja, fibra de trigo, farinha de arroz, aveia, quinua real, semente de linhaça e fubá de milho branco, que são ricos em fibras que auxiliam o processo de digestão e regulam o intestino. Essas misturas podem ser adicionadas ainda de levedo de cerveja, sendo que algumas marcas comerciais possuem também guaraná em pó e cacau (ABRIL, 2010).

Essas misturas têm ganhado popularidade entre os consumidores de produtos saudáveis. Há atualmente uma ampla divulgação acerca dos benefícios à saúde provenientes da ingestão regular do produto (ABRIL, 2010). Os alimentos ricos em fibras têm apresentado demanda crescente por parte dos consumidores, visto que possuem efeitos benéficos, como a diminuição da constipação intestinal pelo aumento do bolo fecal, redução do risco de doenças cardiovasculares, e redução dos níveis de insulina no sangue e da concentração de lipídeos em pacientes insulinodependentes (GRANADA et al., 2003).

As misturas de cereais vinham sendo denominadas “ração humana”, até que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC n$^{o.}$ 259/2002, em 20 de maio de 2011, informou que a expressão “ração humana” não poderia ser utilizada como denominação de venda desses produtos, pois o uso dessa expressão poderia gerar dúvidas para os que consomem esses produtos, uma vez que não indica a verdadeira natureza e características desse alimento. Além disso, para a ANVISA, a substituição das refeições diárias por produtos com alto teor de fibras

como misturas de cereais, farinhas e farelos podem causar problemas de saúde, por não oferecerem todos os nutrientes necessários a uma alimentação adequada (ANVISA, 2011).

2.3 Contaminação fúngica em cereais

Os cereais estão entre as matérias-primas mais utilizadas em diversas regiões do mundo, devido à sua composição química e propriedades tecnológicas.

No entanto, suas características nutricionais os tornam susceptíveis ao ataque de microrganismos tanto de campo quanto de armazenamento, incluindo fungos, sendo estes responsáveis por grande parte dos prejuízos na agricultura (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002). A superfície dos grãos apresenta alguns microrganismos adquiridos durante seu desenvolvimento. Dentre os microrganismos contaminantes, destacam-se os fungos disseminados no meio ambiente, procedendo do solo, insetos, água e ar. Os grãos de cereais recém-colhidos podem conter desde nenhum a várias centenas de esporos de fungos (FRAZIER et al., 1993; PUTZKE e PUTZKE, 2004).

Os fungos são microrganismos amplamente distribuídos no meio ambiente, incluindo o ar, a água e o solo. Em decorrência disso, os alimentos podem ser contaminados por uma grande variedade de espécies fúngicas, as quais são originárias dessas fontes ambientais. Em condições favoráveis, podem se multiplicar no alimento e provocar a degradação do mesmo. Esses microrganismos apresentam grande facilidade de crescimento em vários tipos de substratos e em condições que outros microrganismos não são capazes de se desenvolver, incluindo baixa atividade de água, pH ≤ 3,0, crescimento em uma ampla faixa de temperatura, utilização de uma grande variedade de substratos como fontes de carbono, nitrogênio e energia e

capacidade de esporulação e disseminação em diferentes condições (TANIWAKI & SILVA, 2001).

Os fungos são importantes por diversas razões, pois assim que crescem nos alimentos ocasionam mudanças indesejáveis, tanto na composição química quanto na estrutura e aparência. Dessa forma, resulta em perdas econômicas, pois o alimento é recusado (TANIWAKI & SILVA, 2001). A qualidade sanitária dos grãos e cereais colhidos tem merecido grande atenção, tornando evidente que, além do clima favorável para o crescimento de microrganismos, as práticas culturais adotadas têm sido uma aliada, influenciando diretamente a infecção da matéria prima colhida (MASCARENHAS et al., 1995). Fungos de armazenamento, como *Aspergillus* spp*. e Penicillium* spp. podem gerar a deterioração dessa matéria prima com alto teor de água ou armazenadas em ambiente com umidade relativa elevada (MENTEN, 1991).

A presença de fungos em cereais ou sementes pode acarretar doenças às culturas agrícolas, podendo também gerar alterações no metabolismo das plantas, comprometendo suas propriedades terapêuticas e sabor. No armazenamento, alguns fungos provocam alterações físico-químicas nos tecidos das sementes e cereais, causando perda de lipídeos, carboidratos, proteínas e aumento de ácido graxo, além de implicar na germinação das sementes (NEERGAARD, 1979).

A contaminação fúngica tem também importância pela possibilidade de produção de micotoxinas. Alguns fungos filamentosos, sob certas condições de umidade, oxigênio e temperatura, crescem nos alimentos, produzindo estes metabólitos secundários capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos em animais vertebrados, incluindo o homem (COULOMBE, 1991). As micotoxinas são substâncias estáveis, passíveis de serem transferidas pela cadeia alimentar,

podendo aparecer nos alimentos que foram contaminados mesmo após o seu processamento (RODRICKS & STOLOFF, 1987). Deve-se ressaltar que, embora o fungo em si esteja ausente em seus produtos manufaturados, as micotoxinas podem permanecer estáveis (MOSS, 1992).

Estudos já demonstraram que cerca de 25% de todas as *commodities* produzidas no mundo estão contaminadas com micotoxinas (BHAT & MILLER,1991). Sabino et al. (1995) descreveram que a contaminação por aflatoxinas em alimentos representa um sério problema no Brasil, devendo-se levar em conta os fatores que contribuem de forma negativa na contaminação, seja pelo clima favorável, ou pelas práticas inadequadas na agricultura e más condições de estocagem.

Portanto, o controle da contaminação deve ser iniciado desde o plantio, para garantir a qualidade do produto livre dos fungos produtores de toxinas, uma vez que, depois de contaminados, sua descontaminação é muito mais difícil, pois os métodos de detoxificação dos alimentos exigem processos como, por exemplo, expô-lo a temperaturas elevadas de até 300°C para poder eliminar a toxina e o fungo. Porém, tal situação pode acabar por destruir o alimento, no caso dos grãos em questão (ROSMANINHO et al., 2001).

No Brasil, ainda que sejam responsáveis por significativos prejuízos na produção de grãos, praticamente não há avaliações das perdas econômicas relacionadas às micotoxinas. Até mesmo em países em que há utilização de alta tecnologia para produção e armazenamento, as perdas por presença dessas toxinas são grandes. A proporção das perdas econômicas devido às micotoxinas muitas vezes não é clara o bastante, porém, é grande e ocorre em vários níveis, como por exemplo, pela perda direta de produtos agrícolas, perda de animais acompanhada de diversas taxas de morte, doenças humanas e diminuição da produtividade,

diminuição da velocidade de crescimento em animais, custos indiretos dos sistemas de controle utilizados para algumas micotoxinas, custos de detoxificação de produtos para recuperação e rejeição de produtos pelo mercado importador (TANIWAKI et al., 2013). Dados divulgados pela ALLTECH (2013) mostraram que no ano de 1980 os produtores e processadores de milho da Carolina do Norte (EUA) perderam cerca de 30 milhões de dólares.

A microbiota fúngica predominante em cereais inclui, geralmente, os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, os quais abrigam as principais espécies de fungos toxigênicos em alimentos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Cirio et al. (2003), pesquisando o crescimento fúngico em híbridos de milho, utilizaram 75 sementes de milho híbridos durante o período de 270 dias de armazenamento. Foi verificada infecção fúngica nas sementes de milho pelo gênero *Aspergillus*. SILVA & LOURENÇO JUNIOR (2009) detectaram alta porcentagem de fungos associados às sementes de quinua, sendo o gênero *Aspergillus* o mais detectado. Em pesquisa realizada por Vecchia et al. (2007), verificou-se que em amostras de granola adquiridas no Mercado Público de Porto Alegre, houve desenvolvimento de fungos de vários gêneros, entre os quais *Mucor circinelloides, Rhizopus* sp.*, Alternaria* sp., *Micelia sterilia* e também *Aspergillus, Fusarium* e *Penicillium.*

2.3.1. Fungos do gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* foi catalogado pela primeira vez em 1729 pelo padre italiano e botânico Pier Antonio Michelli, que, observando o fungo no microscópio, lembrou-se da forma de um “aspergillum” (borrifador de água santa), e nomeou a espécie de acordo com o objeto (ANDRADE & LIMA, 2010). Entretanto, Johan Heinrich Friedrich, em 1809, foi o primeiro que definiu o gênero de forma mais clara

(MACKENZIE, 1988; SMITH & ROSS, 1991). Entretanto, com o advento da microscopia óptica, em 1856, Rudolf Virchow apresentou as características micromorfológicas de *Aspergillus* spp. associado a lesões pulmonares em papagaios, falcões e no homem (MACKENZIE, 1988; BENNETT, 2009).

O gênero *Aspergillus* é composto por mais de 180 espécies anamórficas (PITT e SAMSOM, 2000), sendo dividido em sete subgêneros, que são posteriormente divididos em seções (KLICH, 2002). As colônias pertencentes ao gênero *Aspergillus* caracterizam-se pelo crescimento de colônias coloridas e brilhantes. As espécies da seção *Flavi*, as quais incluem *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, variam de verdes a amarelo-oliva, ainda que eventualmente possam apresentar coloração amarelo puro, tornando-se acinzentadas com o tempo (GEISIN, 2000).

Os *Aspergillus s*ão classificados como ascomicetos, a maior classe do reino *Fungi.* Sua reprodução ocorre por meio de esporos, tanto na fase assexuada quanto na sexuada. Na forma assexuada, os esporos (conídios) formam-se nas extremidades das hifas especializadas, denominadas conidióforos, formando típicas cabeças em forma de “escovão” (PITT & HOCKING, 2009). Os esporos, ao entrarem em contato com o meio, germinam e originam novos micélios.

Como as espécies do gênero *Aspergillus* são encontradas na microflora do ar, são encontrados com grande frequência como contaminantes. Crescem em elevadas concentrações de açúcar e sal, e são capazes de extrair água de substratos relativamente secos. Este gênero é economicamente importante, pois algumas de suas espécies são utilizadas em várias fermentações, incluindo a produção de ácidos cítrico e glutâmico (COLE et al., 1985).

O gênero *Aspergillus* é composto por algumas espécies toxigênicas e outras causadoras de deterioração em grãos e sementes. São saprófitas cosmopolitas e de disseminação fácil por seus esporos serem leves e secos. São xerofílicos, ou seja, podem crescer em baixa atividade de água, sendo os primeiros a se desenvolverem nas condições de baixa umidade dos grãos e sementes, assim, facilitando o desenvolvimento de outros gêneros que necessitam mais umidade (NEERGAARD, 1979; BERJAK, 1987; MILLS, 1983; GRIFFIN, 1994; LUZ, 1995; PUZZI, 2000). Menos de 50% dos isolados de *A. flavus* são toxigênicos (KLICH & PITT, 1988).

A espécie *Aspergillus flavus* é uma das espécies mais importantes do gênero, por ter a capacidade de produzir aflatoxinas (PITT & HOCKING, 2009). No entanto, menos de 50% dos isolados de *A. flavus* são toxigênicos (KLICH & PITT, 1988).

Para esta espécie, a temperatura mínima de crescimento é em torno de 12°C e a máxima próxima de 48°C, porém, a temperatura ideal é entre 25°C e 42°C. O pH ótimo para crescimento é 7,5 e a Aa mínima é de 0,80 a 37°C com umidade relativa do ar entre 80% e 90%. Sendo assim, é caracterizado como fungo de armazenamento (PITT & HOCKING, 2009). Para a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*, a produção pode ocorrer entre 13°C a 37°C, com Aa acima de 0,82, sendo as condições ótimas entre 16°C a 31°C e 0,95 a 0,99 de Aa (PITT & HOCKING, 2009).

Esta espécie cresce bem em substratos oleaginosos, o que aumenta o nível de produção de aflatoxinas. Também são encontrados, mas com menor frequência, em substratos ricos em amido, como o milho, podendo também produzir aflatoxinas (XAVIER et al., 1991; POZZI et al., 1995; CASTRO, SOARES, FURLANI, 1995). As espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* têm grande afinidade por castanhas, como castanha-do-Brasil e sementes oleaginosas. Amendoim, milho e

sementes de algodão são seus mais importantes substratos, além do trigo, girassol, sorgo e pimenta preta (COLE et al., 1985).

A espécie *A. flavus* é capaz de se adaptar e crescer em qualquer cultura armazenada, sendo assim caracterizado como fungo de armazenamento. A contaminação por este agente é de grande preocupação, pois este fungo é conhecido pela sua agressividade, sendo o causador da podridão do armazenamento e tem a capacidade de produzir aflatoxinas em sementes e grãos (ABBAS, 2005). Pode ainda ter como auxílio micro fissuras nas superfícies das sementes, causadas por insetos ou choques mecânicos, práticas agrícolas inadequadas durante a colheita, transporte e armazenamento e ótimas condições de umidade e temperatura (ANDRADE & LIMA, 2010).

2.3.2. Fungos do gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* foi estabelecido por Link (1809) a cerca de 200 anos atrás, englobando diversas espécies de grande importância por serem espécies fitopatogênicas, com capacidade de produzir uma grande variedade de micotoxinas.

As espécies de *Fusarium* são saprófitas do solo com distribuição mundial (BOZZA, 2010).

Este gênero inclui uma série de espécies nativas encontradas no mundo inteiro sob diversas condições climáticas, desenvolvendo-se em várias espécies de plantas (DOOHAN et al., 2003), principalmente no milho (MALLMANN et al., 1999).

Espécies do gênero *Fusarium* são classificadas como imperfeitas, por serem caracterizadas por um micélio hialino, ramificado e tabicado, com esporóforos em forma de fiálides e conídios de forma e tamanho variável (BOZZA, 2010). As espécies produzem macroconídios multicelulares longos, em forma de canoa ou em

forma de banana. Estes macroconídeos são de reprodução assexuada, sendo esta a característica morfológica que define o gênero (GLENN, 2007).

Entre as espécies de *Fusarium*, as condições para crescimento e a produção de fumonisinas variam. Para o crescimento das colônias de *Fusarium graminearum,* a temperatura ótima para o crescimento e produção de fusariotoxinas está entre 24°C e 26°C e Aa próxima a 0,90 (entre 15°C – 25°C). O pH mínimo para crescimento é próximo de 3,0 com temperatura entre 25°C e 37°C e um pH máximo de 10,2 em baixas temperaturas. Para *Fusarium verticillioides*, a temperatura máxima para crescimento e produção de fumonisina está entre 32°C e 37°C, com a mínima entre 2,5°C e 5°C, e ótimo próximo a 25°C, com Aa mínima por volta de 0,87 (PITT & HOCKING, 2009).

Mills (1989) cita que as espécies do gênero *Fusarium* são as principais invasoras de grãos no campo, principalmente de milho, causando diversas doenças, como a podridão de sementes e colmo. Além de invadirem a planta no campo, também são encontradas no armazenamento, caso as condições externas, como temperatura e umidade, estejam adequadas para o seu crescimento. Algumas espécies deste gênero foram isoladas de grãos de milho e outros substratos procedentes de vários estados brasileiros, com predominância da espécie *Fusarium verticillioides* (POZZI et al., 1995).

O *Fusarium* causa estragos a plantações e prejuízos que geram perdas de bilhões de dólares no mundo. A ingestão de alimentos que contenham micotoxinas produzidas por este fungo pode causar enormes prejuízos para a saúde humana e animal (BOZZA 2010). As espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisinas incluem o *F. verticillioides* e *F. proliferatum.* Todas essas espécies são isoladas do milho, sendo a primeira a mais prevalente (JURGENSON et al., 2002).

Em estudo realizado por Ono et al. (1996) utilizando amostras de milho no estado do Paraná, região de clima subtropical, foi observada uma grande presença de *F. verticillioides* dentre as espécies de fungos encontradas. Entretanto, este estudo observou não haver diferença significativa nas contaminações, considerando as variações de temperatura e de umidade relativa, podendo, assim, as maiores contaminações serem resultados de um maior índice pluviométrico no período que decorreram os estudos (ONO et al., 1999).

2.4 Micotoxinas

As micotoxinas são substâncias químicas que incluem um conjunto complexo de substâncias tóxicas produzidas por fungos filamentosos (bolores) que, sob certas condições de umidade, oxigênio e temperatura, crescem em produtos agrícolas e alimentos, liberando metabólitos secundários, capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos em animais vertebrados, incluindo o homem (COULOMBE, 1991).

O termo micotoxina tem sua origem da palavra grega “mykes”, que significa fungo, e do latim “toxicum” que significa veneno ou toxina (BULLERMAN, 1979). São pertencentes a diferentes classes químicas, principalmente policetídeos, isoprenos e aminoácidos. São substâncias estáveis, passíveis de serem incorporadas na cadeia alimentar, podendo aparecer nos alimentos que foram contaminados mesmo após o seu processamento. Podem causar doenças, levando até a morte de animais, inclusive o homem, se estes consumirem alimentos contendo quantidades acima dos níveis tolerados pelo organismo (RODRICKS & STOLOFF, 1987).

Cerca de 400 tipos de micotoxinas são conhecidos, embora somente algumas delas tenham sido profundamente estudadas (ETZEL, 2002). Estáveis e

termorresistentes, as micotoxinas dificilmente são eliminadas por meio de controles de temperatura e produtos químicos (ANVISA, 2011). Sua presença em alimentos constitui um grave problema de saúde pública e para a qualidade dos alimentos.

Entre as micotoxinas de importância para a saúde pública e agroeconômica encontram-se as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas (EMBRAPA, 2013).

A exposição no homem e animais normalmente ocorre pelo consumo de alimentos contaminados, o que frequentemente provoca reações sob a forma de hemorragias e necroses. Muitas micotoxinas têm afinidade por algum órgão ou tecido, sendo fígado, rins e sistema nervoso os mais frequentemente comprometidos (EMBRAPA, 2013).

Os casos de micotoxicoses no mundo são antigos. Em 1850 ocorreram casos de “Fogo de Santo Antônio”, nos quais os sintomas eram sensações de formigamento, distorções na face, paralisia, alucinações e gangrena de extremidades, sintomas relacionados ao ergotismo, causado pelo fungo *Claviceps purpurea*, fungo parasita de centeio e outras gramíneas silvestres e cultivadas como trigo, cevada, aveia e sorgo. De ocorrência na Europa Central, a doença fez muitas vítimas na Idade Média devido ao consumo de pão feito com grãos de centeio contendo escleróciosdo fungo, cujo tecido possui alcaloides tóxicos (SANTURIO, 2000).

2.4.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas ganharam importância como contaminantes tóxicos desde o ocorrido na Inglaterra, em 1960, quando Stevens et al. (1960) descreveram a morte de aproximadamente 100.000 perus apresentando sintomas típicos de

ingurgitamento e congestão renal com hemorragia e necrose do fígado, após comerem ração contendo torta de amendoim de origem brasileira (BLOUNT, 1961; ASPLIN e CARNAGHAN, 1961). O episódio foi atribuído a uma nova doença denominada por Blount (1961) de “Turkey X Disease”.

Aflatoxina é a denominação dada a um grupo de substâncias muito semelhantes, heterocíclicas e altamente oxigenadas, tóxicas ao homem e animais. 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 30ºC (COULOMBE, 1991). As aflatoxinas são denominadas conforme sua fluorescência, B (blue) e G (green) por apresentarem fluorescência azulada e esverdeada, respectivamente, quando observadas sob luz ultravioleta a 365 nm. Isolados de *A. flavus* produzem somente aflatoxinas do grupo B (KLICH & PITT, 1988).

As aflatoxinas têm a capacidade de se desenvolver em vários tipos de substratos como milho, sorgo, cevada, trigo, centeio, amendoim, soja, arroz, algodão e seus derivados (AGAG, 2004), havendo também relatos em nozes, ervilhas, semente de girassol, aveia, arroz, painço, castanha do Pará, pistache, avelã, leite e produtos lácteos, ovos, algumas frutas secas e chás (SCUSSEL, 1998).

São conhecidos 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, sendo os principais tipos identificados como B_1, B_2, G_1 e G_2 (COULOMBE, 1991) (Figura 1).

As aflatoxinas apresentam diferentes graus de atividade biológica: a aflatoxina B_1 (AFB_1), além de ser a mais frequentemente encontrada em substratos vegetais, é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de G_1, B_2 e G_2 (MOSS, 1998). Com base nos estudos disponíveis, a *International Agency for Research on Cancer* –

IARC, classificou a AFB_1 como pertencente à classe 1 – carcinógeno humano (ROTHSCHILD, 1992).

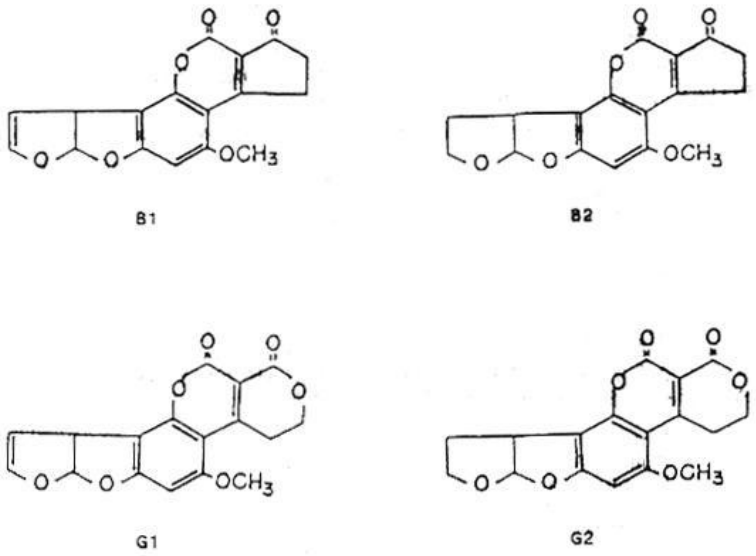

Figura 1. Estrutura química das aflatoxinas. FONTE: DINIZ (2002).

As aflatoxinas possuem baixo peso molecular, tendo a B_1 312,2782 g/mol, a B_2 314,294 g/mol, a G_1 328,2776 g/mol e a G_2 330,2934 g/mol, o que as torna pouco solúveis em água (10-30 µg/mg) e muito solúveis em solventes moderadamente polares, como clorofórmio, metanol e dimetilsulfóxido. Portanto, são relativamente sensíveis à luz, sendo que a radiação ultravioleta é a mais prejudicial para a micotoxina. Quando secas, estas ficam estáveis em temperaturas elevadas e o ponto de fusão das mesmas está entre 268 - 269°C, 286 – 289°C, 244 – 246°C 237 – 240°C para B_1, B_2 G_1 e G_2 respectivamente, sendo destruídas em presença de amônia e em tratamentos com hipoclorito (substâncias com pH > 10,5) (WHO, 1979).

A exposição às aflatoxinas pode ter efeitos agudos ou crônicos, dependendo da dosagem e frequência de exposição, podendo a longo prazo ser relacionada à incidência de tumores (CAST, 2003).

A rápida absorção da AFB_1 pelo sistema gastrointestinal é uma das causas da alta toxicidade desta micotoxina, facilitando a entrada na circulação sanguínea e seu transporte para o fígado, principal local de biotransformação (DALEZIOS et al., 1973). É neste órgão que ocorre a ativação metabólica e em seguida reações com macromoléculas e organelas celulares. Na primeira fase da biotransformação, as reações às quais envolvem a conversão da AFB_1 em vários outros metabólitos são mediados, em maior escala, pelo citocromo P-450, que é ligado às mono-oxigenases, que possuem função mista. Esse sistema enzimático está presente nos componentes da membrana do retículo endoplasmático dos hepatócitos e tem como função facilitar a hidroxilação, demetilação, redução e epoxidação, que ocorrem durante o método de biotransformação. Ao final da primeira fase, são gerados vários metabólitos, como AFM_1 (ALLCROFT e CARNAGHAN, 1963), AFQ_1 (BUCHI et al., 1974; MASRI et al., 1974), AFP_1, AFB_1-2´3-epóxido e AFB_{2a}. Ainda, outros metabólitos podem ser formados por reações de redução catalisada por um sistema de redutase citoplasmático NADPH-dependente, assim como o aflatoxicol, aflatoxicol M_1 e aflatoxicol H_1. O aflatoxicol é considerado como um depósito de AFB_1 no espaço intracelular, podendo este ser convertido nesta micotoxina através da desidrogenase microssômica (DALEZIOS et al., 1973)(Figura 2).

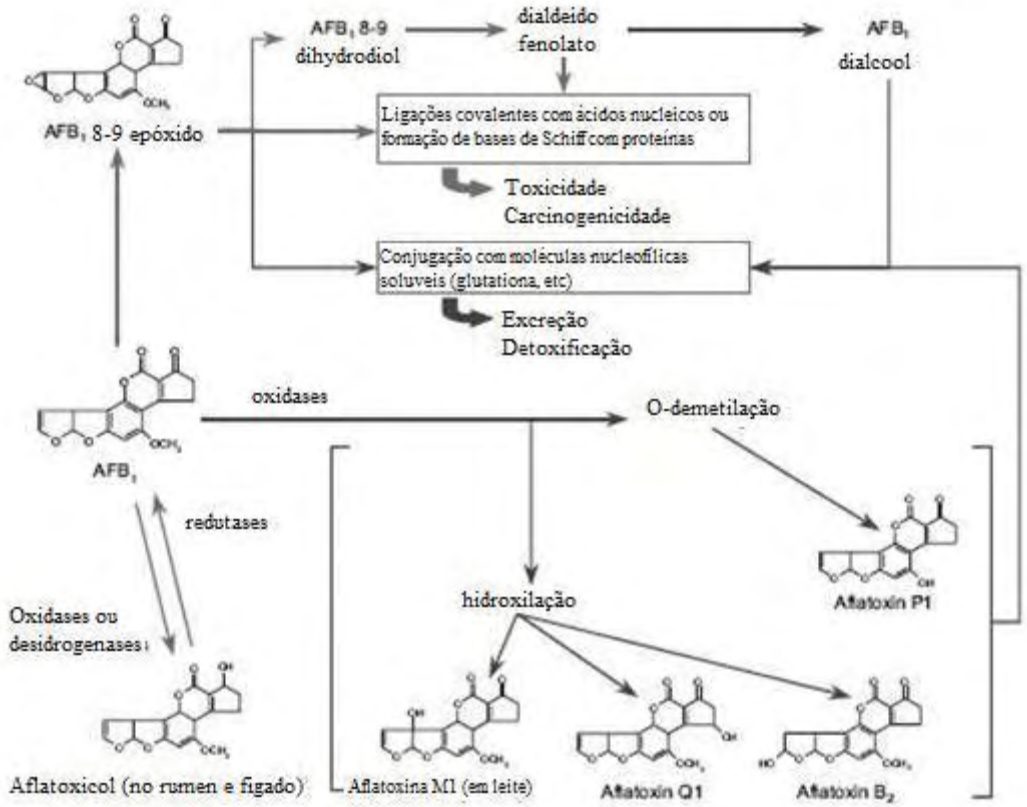

Figura 2. Metabolismo da aflatoxina B_1 no fígado. Processos de detoxificação são mostrados em negrito e os demais são aqueles que conduzem à toxicicidade ou carcinogenicidade. FONTE: YIANNIKOURIS & JOUANY (2002).

Em Saúde Pública, as aflatoxinas estão relacionadas com a etiologia do câncer hepático no homem, como consequência da ingestão de alimentos contaminados (MCLEAN & DUTTON, 1995). A AFB_1 é considerada a mais tóxica das aflatoxinas (COULOMBE, 1991) e é considerada uma das substâncias mais carcinogênicas conhecidas encontradas na natureza, sendo também a mais frequentemente encontrada em alimentos contaminados com aflatoxina (SHARMA e SALUNKE, 1991).

Resultados de mais de 2.500 análises de micotoxinas realizadas no Rio Grande do Sul, entre 1987 a 1994, revelaram que 25% do milho produzido no Brasil estava contaminado por aflatoxinas, sendo que aproximadamente 15% apresentou níveis de contaminação superiores a 20 µg/kg (SANTÚRIO, 1996). Estudo realizado por Widiastuti et al. (1988) avaliou amostras de milho e ração para frangos vindas da Indonésia, obtendo-se 96% e 95% das amostras de milho e ração, respectivamente, contaminadas com aflatoxinas. A aflatoxina B_1 prevaleceu, seguida por baixos níveis de AFB_2, enquanto que AFG_1 e AFG_2 foram encontradas em apenas 33 e 14% de amostras de milho e 7 e 2% em amostras de ração, respectivamente. Nas amostras de milho, a concentração de aflatoxinas variou entre 1 e 20.000 µg/kg, enquanto que na ração variou entre 1 e 500 µg/kg.

Em pesquisa realizada por Einloft et al. (2009) foram analisadas amostras de amendoim, sendo oito de amendoim em grão pronto para consumo e 20 de produtos derivados. Foi encontrada aflatoxina B_1 em três amostras, representando 10,71% dos 28 produtos analisados, sendo duas pertencentes ao grupo dos produtos derivados e uma de amendoim em grão pronto para o consumo. Os níveis de aflatoxina B_1 encontrados foram de 31,8 e 22,0 µg/kg nos produtos derivados e de 87,5 µg/kg na amostra de grão pronto para o consumo. Esses níveis ultrapassam o limite estabelecido pela resolução brasileira de 20 µg/kg para a soma das aflatoxinas $B_1+G_1+B_2+G_2$.

A mais recente legislação brasileira que dispõe sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos é a Resolução RDC 7 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 18 de fevereiro de 2011, que entrou em vigor em 22 de fevereiro de 2011. Esta resolução estabelece o limite máximo de 20,0 µg/kg de aflatoxinas totais ($B_1+B_2+G_1+G_2$) para milho em grão, farinhas ou sêmolas de milho,

amendoim em casca e descascado, cru ou tostado, pastas e manteiga de amendoim (ANVISA, 2011).

O Regulamento da União Europeia n° 165/2010, de 26 de fevereiro de 2010, fixa os teores máximos de aflatoxinas em alimentos para consumo humano. Para cereais e produtos derivados de cereais os teores máximos permitidos são de 2,0 µg AFB_1/kg e 4,0 µg/kg para aflatoxinas totais (B_1, B_2, G_1 e G_2) (Official Journal of the European Union, 2010).

2.4.2 Fumonisinas

As fumonisinas são micotoxinas produzidas por espécies fúngicas do gênero *Fusarium* (VINCELLI et al., 2002). Desde que foram descobertas, em 1988 na África do Sul, as fumonisinas têm sido detectadas em diversas variedades de milho e seus produtos (FANDOHAN et al., 2004), tendo sido relacionadas a problemas na saúde de animais e humanos, pela ingestão de produtos contaminados (REDDY et al., 1996).

As fumonisinas são produzidas por uma série de espécies do gênero *Fusarium*, dentre as quais se destacam *F. proliferatum e F. verticillioides* (VINCELLI et al., 2002).

Sabe-se que cepas de *Fusarium verticillioides* são capazes de produzir várias micotoxinas, como a moniliformina, fumonisinas, fusarinas, ácido fusárico, fusariocinas e zearalenona (HENRY et al., 2000). As fumonisinas foram quimicamente caracterizadas por Bezuidenhout et al. (1988) como poliálcoois, apresentando uma estrutura química básica correspondente ao 2-amino- 12, 16, dimetilpoliidroxilicosano, esterificado com ácido tricarboxílico -1, 2, 3 propano, nos carbonos 14 e 15.

Com distribuição mundial, as espécies de *Fusarium* como o *F. verticillioides* estão entre os fungos de campo, ou seja, são importantes patógenos de cereais, no decorrer de seu desenvolvimento (DIAZ et al., 1994), encontrando condições mais favoráveis para crescimento antes da colheita, com umidade relativa acima de 80% e umidade do grão acima de 22%. Porém, esse fungo não contamina de forma isolada, sendo a microflora do grão parte importante para a determinação do seu desenvolvimento e produção de fumonisina. Entretanto, havendo a contaminação, podem permanecer viáveis no substrato por alguns meses após a colheita. A estabilidade da fumonisina ao calor garante a sua presença constante em grande parte dos cereais, mesmo após diferentes formas de processamentos (MOSS, 1998). Portanto, o fato de o *Fusarium verticillioides* ser encontrado em praticamente todas as amostras de milho, mesmo com baixos níveis de contaminação por fumonisinas (menores do que 1 mg/kg) é extremamente comum (COUNCIL FOR AGRICULTURE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

As fumonisinas são distinguidas também como moléculas de características polares, sendo solúveis em água e em solventes polares (SHEPHARD, 1998) (Figura 3). A fumonisina B_1, quando pura, é higroscópica, solúvel em água. Nos alimentos, é estável a temperaturas de processamento e à luz (WHO, 2000). Estudos vêm demonstrando que a fumonisina B_1 apresenta atividade carcinogênica, sendo hepatotóxica, nefrotóxica e hepatocarcinogênica, sendo a mais tóxica entre as fumonisinas (MALLMANN et al, 1999).

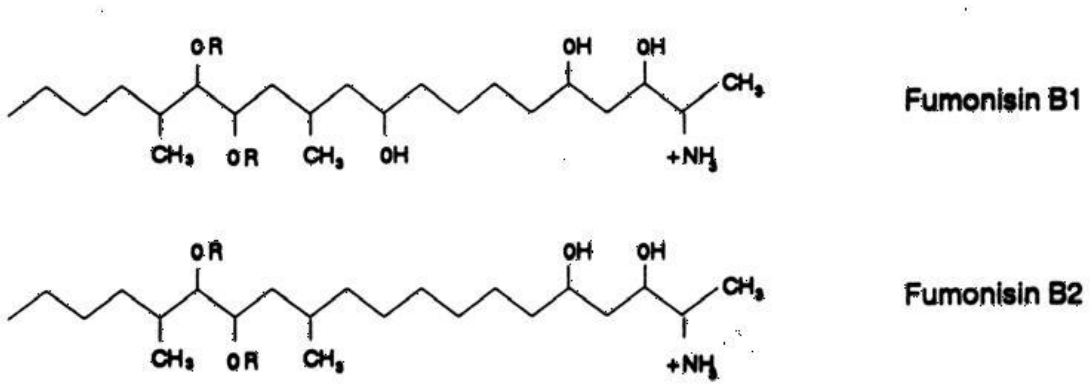

Figura 3. Estrutura Molecular das Fumonisinas B_1 e B_2. Fonte: DIAZ & BOERMANS (1994).

Das fumonisinas identificadas até o momento, as FB_1, FB_2 e FB_3 são as mais isoladas em alimentos naturalmente contaminados, sendo que a FB_1 é quase sempre a mais abundante, representando cerca de 70% da concentração total das fumonisinas detectadas (SYDENHAM et al., 1991; THIEL et al., 1991).

A fumonisina, classificada no grupo 2B, segundo a IARC – *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2002), já foi relacionada a casos de incidência de câncer esofágico em humanos na África do Sul, na China, no nordeste da Itália e no sudeste dos Estados Unidos (BULLERMAN, 1996), existindo assim, uma forte ligação entre câncer de esôfago, milho e seus subprodutos contaminados com *F. verticilioides* (HIROOKA, 1996; NAIR, 1998; REEDHER et al., 1992).

Em estudo realizado em Ghana, país do oeste da África, analisando 14 amostras de milho destinadas ao consumo humano, todas apresentaram concentrações de fumonisinas a qual variou entre 0,07 a 4,22 mg/kg, com média de 0,84 mg/kg (KPODO et al., 2000). Ainda, 91% das subespécies de *Fusarium verticillioides* isoladas de amostras de milho avaliadas foram classificadas como fortes produtoras de fumonisina (FANDOHAN et al., 2004).

Em ratos tratados com milho contendo fumonisinas, os órgãos alvos foram o fígado e os túbulos renais proximais (NORRED et al, 1992). Assim, parece haver uma afinidade da toxina por rins e fígado, havendo um acúmulo rápido de resíduos em dietas contendo 2 a 3 ppm de FB_1 (PRELUSKY et al., 1996). Em estudo *in vitro* realizado com células humanas de fígado, Ehrlich et al. (2002) avaliaram que a FB_1 pode atuar como carcinogênico genotóxico em humanos.

Mesmo sabendo que as fumonisinas são citotóxicas e carcinogênicas, seu mecanismo molecular de ação não é totalmente conhecido. Em estudo realizado por Norred et al. (1992) com o objetivo de analisar os efeitos toxicológicos *in vitro* das fumonisinas, foi observado que essas micotoxinas são potentes inibidoras da biossíntese de esfingolipídeos. Estes são responsáveis por uma série de funções, incluindo regulação do crescimento celular a comunicação célula-célula, diferenciação, transformação celular e morte celular (apoptose e necrose), respostas imunes (RILEY et al., 1998; NORRED et al., 1992), diferenciação e transformação neoplástica, interação entre célula e substrato, além de possíveis interações entre receptores celulares e sistemas sinalizadores (WANG et al., 1991).

Estudos foram realizados com fumonisinas e macacos da espécie Vervet durante vários anos. Estes estudos levantaram a possibilidade de que as fumonisinas poderiam estar envolvidas com outras doenças humanas. Foi constatada uma resposta aterogênica e uma hipercolesterolemia relacionada com a incorporação de 0,5% de material de cutura de *Fusarium spp.* à dieta dos animais. A dose de fumonisinas administradas aos animais, sob esse nível de inclusão de FCM era de 209 a 547 µg/kg de peso vivo/dia. Também foram observadas evidências de dano hepático, sendo que a resposta aterogênica seria secundária aos efeitos hepatotóxicos ocasionados pelo fungo (FINCHAM et al., 1992). Esses achados são

interessantes, visto que na China foi verificada uma alta incidência de aterosclerose dentre os indivíduos vindos do norte do país, sendo que essa parcela população tem a dieta baseada no consumo de milho, enquanto que a população vinda do sul tem a dieta baseada no consumo de arroz (CHANG et al., 1991).

Marín et al. (1998) estudaram interações entre *Fusarium* e *Aspergillus niger* que procederam um aumento de dez vezes na concentração de fumonisinas, principalmente em atividade de água de 0,98.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aquisição das amostras

As amostras foram adquiridas pela internet e em supermercados dos municípios de Campinas e Pirassununga/SP, devido à instabilidade da disponibilidade em muitas das empresas que o comercializam pela internet. Foram adquiridas 105 amostras de misturas de cereais, dentro do prazo de validade e pertencentes a marcas e lotes diferentes. A unidade amostral foi constituída pela embalagem original fechada.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório "Multiusuário de Microbiologia" (FZEA/USP – *Campus* de Pirassununga) e devidamente identificadas, incluindo a anotação da composição da mistura, dados do fabricante, local de fabricação, lote e/ou data de fabricação e validade.

Os produtos foram armazenados nas respectivas embalagens e mantidos em temperatura ambiente até o início das análises. As amostras foram analisadas no prazo máximo de cinco dias após o recebimento do produto.

3.2 Atividade de água (Aa)

As amostras foram submetidas à determinação da atividade de água, para avaliar a quantidade de água disponível nos produtos, através do aparelho AquaLab Dew Point Water Activity Meter 4TE.

3.3 Avaliação da microbiota fúngica

Dez gramas de cada amostra, previamente homogeneizadas, foram diluídas em 90 mL de água destilada estéril (diluição 10^{-1}). A partir desta, foram realizadas diluições sucessivas até 10^{-4}, com a inoculação de 0,1 mL em meio de cultivo DG18 (PITT et al., 1983). As placas foram incubadas a temperatura de 25°C por cinco dias e após este período foi efetuada a contagem de colônias. A partir deste resultado, foi aplicada correção pelo fator de diluição, para o cálculo do número de unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC/g) (BUSTA et al, 1984).

As colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em ágar batata e identificadas pela da técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950). Foi também utilizada uma triagem em meio AFPA (Ágar *Aspergillus flavus* e *parasiticus*). Os fungos foram classificados até gênero, seguindo o livro de St-Germain & Summerbell (1996), enquanto aqueles pertencentes ao gênero *Aspergillus* seção *Flavi* foram classificados em espécie, conforme descrito a seguir.

3.4 Sequenciamento do DNA ribossomal das cepas de *Aspergillus* Seção Flavi isoladas

O DNA ribossomal foi extraído e purificado diretamente das colônias fúngicas a partir do ágar yeast extract sucrose (YES) (ABDOLLAHI e BUCHANAN, 1981; DEGOLA et al., 2007), seguindo o protocolo do kit PrepMan Ultra® (Applied

Biosystems, EUA). A concentração de DNA foi mensurada por espectrofotometria (GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator, GE Healthcare, EUA), segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280}.

Um fragmento de aproximadamente 650 pb da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal foi amplificado por um protocolo de termociclagem (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA), que incluiu etapas de desnaturação (94ºC por 3 min.), seguido por ciclos de desnaturação (94ºC por 1 min.), anelamento (57ºC por 1 min.), e extensão (72ºC por 1 min.) em temociclador .

Fragmentos de tamanho esperado para o Internal Transcribed Spacer (região ITS) do DNA ribossomal foram purificados do gel através do illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, EUA), conforme recomendações do fabricante e, em seguida, submetidos a sequenciamento bidirecional utilizando ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, EUA) em sequenciador automático (ABI Prism Genetic Analyzer 3100, Perkin-Elmer, Applied Biosystems, EUA).

A busca inicial de similaridade das sequências obtidas com aquelas de outros fungos foi realizada pelo programa BLAST versão 2.0 (ALTSCHUL et al., 1997). A edição e alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas obtidas para a região ITS foram realizados com o programa ClustalW versão 1.4 (THOMPSON et al., 1994), implementado no programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.2 (HALL, 1999), utilizando-se, para tanto, dos parâmetros em *default*.

3.5 Avaliação do potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus* isoladas

Para avaliação do potencial aflatoxigênico foi utilizada a técnica preconizada por LIN & DIANESE (1976). Um inóculo da colônia de *Aspergillus*, obtido do cultivo da cepa em ágar Batata Dextrose a 25°C, foi semeado em ágar coco e incubado a 25°C por 15 dias. Após esse período, todo o conteúdo da placa foi transferido para frasco erlenmeyer de 250 mL e para cada 10 g de cultura e ágar foram acrescidos 30 mL de clorofórmio. Os frascos foram submetidos a agitador mecânico horizontal durante 30 minutos. Os extratos clorofórmicos foram filtrados em papel de filtro e recolhidos em frascos âmbar. Os filtrados foram evaporados até resíduo em banho-maria (60ºC) e armazenados a -4ºC até a análise.

A triagem foi realizada através de cromatografia em camada delgada (CCD) com os extratos ressuspendidos em 1 mL de clorofórmio e aplicados 10 µL de cada extrato em cromatofolha de sílica gel G60 (Merck). A cromatografia foi realizada em cuba cromatográfica contendo como fase móvel solução saturada de clorofórmio:acetona (9:1, v/v). Após a corrida cromatográfica, as cromatofolhas foram secas em capela de exaustão e observadas sob luz UV com comprimento de onda (λ) de 360 nm. As manchas das amostras foram comparadas as dos padrões de aflatoxinas (AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2) de acordo com o Rf dos padrões.

3.6 Determinação de aflatoxinas

3.6.1 Construção das curvas de calibração para aflatoxinas

Os padrões de AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2 foram dissolvidos em benzeno-acetonitrila (98+2), e foram calibrados espectrofotometricamente (λ = 350 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 da curva de calibração.

Após diluição dos padrões, as concentrações encontradas por mensuração em espectrofotômetro foram de 7,24 µg de AFB_1/mL, 5,72 µg de AFB_2/mL, 7,18 µg de AFG_1/mL e 5,58 µg de AFG_2/mL. Estas soluções foram utilizadas para preparo de solução de trabalho para cada toxina contendo 1 µg/mL. Esta solução foi utilizada no preparo da curva de calibração (concentrações de 0,05 µg/mL, 0,02 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,005 µg/mL de cada toxina), que foi construída através da injeção de 20 µL de cada solução padrão.

3.6.2 Avaliação do desempenho do método analítico para aflatoxinas

Para avaliar a eficiência da metodologia para a determinação de AF, foram realizados ensaios de recuperação, em amostras artificialmente contaminadas com as toxinas. As amostras foram artificialmente contaminadas com as soluções de trabalho, de maneira a obter níveis de contaminação de 2,0 e 20,0 µg AF/kg. As amostras fortificadas foram preparadas em triplicata para cada nível de toxina, e submetidas ao método descrito, com vistas à obtenção dos percentuais de recuperação e coeficientes de variação dos resultados das análises.

3.6.3 Detecção e quantificação de aflatoxinas

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 (Neocolumn, Neogen®) e determinação através de CLAE, conforme descrito resumidamente abaixo.

No laboratório, a amostra foi previamente homogeneizada. 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 mesa agitadora orbital (30 min.), o extrato foi filtrado em papel de filtro, recolhendo-se 10 mL em um béquer.

Foram adicionados, ao extrato, 40 mL de tampão fosfato, após o que a mistura completamente homogeneizada foi filtrada (filtro de microfibra, 1,5 µm, 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 1-2 gotas/seg.). Após a eluição da amostra, a coluna foi lavada através da passagem de 10 mL de metanol. Em seguida, foi passado 1 mL de metanol:ácido acético (98+2), de maneira que eluiu 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 que foi utilizada na corrida cromatográfica. Em seguida, 500 µL do extrato foram transferidos para outro frasco e evaporado até resíduo sob fluxo de N_2. Foram acrescidos 200 µL de *n*-hexano e 200 µL de ácido trifluoroacético, deixando-se em repouso em banho-maria a 40oC, de acordo com SCOTT (1990). Após nova secagem sob fluxo de N_2, o resíduo foi ressuspendido com 500µL de metanol-água (50+50). Foram injetados 20 µL do extrato derivatizado no sistema CLAE. A sequência metodológica foi representada na Figura 4.

Homogeneização da amostra

↓

50 g da amostra + 5 g de NaCl + 100 mL de metanol:água (80+20)

↓

Agitação a 240 rpm por 30 min. e filtração do extrato em papel de filtro

↓

Recolher 10 mL em um béquer + 40 mL de tampão fosfato salino

↓

Homogeneização e filtração em filtro de microfibra (1,5 µm), recolhendo em um béquer

↓

Passagem de 10 mL do extrato pela coluna, com fluxo de 1,5 – 2,0 mL/seg

↓

Lavagem da coluna com 10 mL de metanol 25% por 2 vezes

↓

Eluição da toxina com 1 mL de metanol:ácido acético (98+2), recolhendo em vial

↓

Passagem de 1 mL de água milliQ pela coluna (volume total no vial 2 mL)

↓

Transferir 500 µL para outro vial, secar e derivatizar

↓

Ressuspender em 500 µL de metanol+água (50+50)

↓

Injeção da mistura no cromatógrafo

Figura 4. Sequência de análise de aflatoxinas em amostras de misturas de cereais.

A separação e a quantificação das aflatoxinas foram conduzidas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu), equipado com detector de fluorescência (excitação: 360 nm e emissão: 440 nm) e coluna Shim-pack CLC-ODS (5 µm) 4,6 x 150 mm, precedida de pré-coluna Shim-pack (5 µm) 4 x 10 mm. Foram injetados 20 µL da amostra filtrada (membrana filtrante PTFE, 0,45 µm, 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.

3.7 Determinação de fumonisinas

3.7.1 Construção das curvas de calibração para fumonisinas

As curvas de calibração para a FB_1 e a FB_2 foram obtidas através do preparo de cinco soluções de cada toxina, a partir da solução de trabalho (20 µg/mL), resultando em concentrações de 5,0 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL, 0,625 µg/mL e 0,132 µg/mL.

As curvas de calibração foram construídas através da injeção de 20 µL de cada solução padrão de FB_1 e de FB_2 no cromatógrafo.

3.7.2 Avaliação do desempenho do método analítico para fumonisinas

Para avaliar a eficiência da metodologia para a determinação de fumonisinas, foram realizados ensaios de recuperação, em amostras artificialmente contaminadas com as toxinas. Para o preparo das amostras experimentais contaminadas com fumonisina, 20 g de amostra foram pesadas em erlenmeyer contendo alíquotas

evaporadas das soluções de trabalho de FB_1 (20 µg FB_1/mL) ou FB_2 (20 µg FB_2/mL), de maneira a obter níveis de contaminação de 0,1 ou 1,0 µg de FB_1 ou de FB_2/g.

As amostras fortificadas foram preparadas em triplicata para cada nível das toxinas, e submetidas à metodologia descrita a seguir, com vistas à obtenção dos percentuais de recuperação e coeficientes de variação dos resultados das análises.

3.7.3 Detecção e quantificação de fumonisinas

A determinação de fumonisinas B_1 e B_2 foi efetuada através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se colunas de imunoafinidade (Fumonitest, Vicam®) para purificação das amostras.

Para a marcha analítica, 20 g da amostra analítica foram colocadas em um erlenmeyer, juntamente com 100 mL de solução metanol:acetonitrila:água (25:25:50) e submetidas a agitação em mesa agitadora por 40 minutos. Após a agitação, o extrato foi filtrado em papel de filtro, recolhendo-se todo o filtrado em um béquer. Foram misturados 10 mL do extrato com 40 mL de PBS, seguido de filtração do extrato diluído através de filtro de microfibra. Foram passados 10 mL (equivalente a 0,4 g da amostra) do extrato diluído pela coluna e esta foi lavada com 10 mL de PBS com fluxo de 1-3 mL/min, sem deixar a coluna secar. A eluição foi efetuada com 3 mL da mistura metanol:ácido acético glacial (98:2) aplicada em três porções de 1 mL. O eluente foi deixado na coluna por um período de tempo antes do escoamento por gravidade. A coluna foi seca com a passagem de ar para remoção do eluente. O resíduo foi evaporado até resíduo em temperatura aproximada de 60ºC. O resíduo foi redissolvido em uma porção de fase móvel e analisado por CLAE após

derivatização com reagente OPA (HPLC-FLD). A sequência metodológica está representada pela Figura 5.

Homogeneização da amostra

↓

20 g de amostra + 100 mL de metanol:acetonitrila:água (25:25:50) em erlenmeyer

↓

Agitação a 240 rpm por 40 min. e filtração do extrato em papel de

↓

filtro Adicionar 40 mL de PBS a 10 mL do extrato

↓

Filtração do extrato diluído através de filtro de microfibra

↓

Passagem de 10 mL do filtrado na coluna

↓

Lavagem com 10 mL de PBS

↓

Eluição com 1mL metanol:ácido acético (98:2) por 3 vezes

↓

Evaporação até resíduo (60ºC)

↓

Ressuspensão do resíduo em fase móvel

↓

Derivatização com reativo OPA

↓

Injeção da mistura no cromatógrafo

Figura 5. Sequência de análise de fumonisinas em amostras de misturas de cereais.

A separação e a quantificação das fumonisinas foram conduzidas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, equipado com detector de fluorescência (excitação: 335 nm e emissão: 440 nm) e coluna Shim-pack CLC-ODS (5 µm) 4,6 x 150 mm, precedida de pré-coluna Shim-pack (5 µm) 4 x 10 mm. Foi utilizada como fase móvel acetonitrila:água:ácido acético (50:50:1), com fluxo de 1,0mL / 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.

3.8 Análise dos resultados

Foram determinadas as medidas de posição e dispersão (média e desvio padrão) dos resultados obtidos (BERQUÓ et al., 1981).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das amostras

As amostras foram devidamente identificadas, incluindo a anotação da composição da mistura (Figura 6), dados do fabricante, lote e/ou data de fabricação e validade. Os produtos foram armazenados nas respectivas embalagens e mantidos à temperatura ambiente.

Das 105 amostras adquiridas, 69 são fabricadas no Estado de São Paulo, 16 no Paraná, 14 em Minas Gerais, 5 no Rio Grande do Sul e 1 em Santa Catarina.

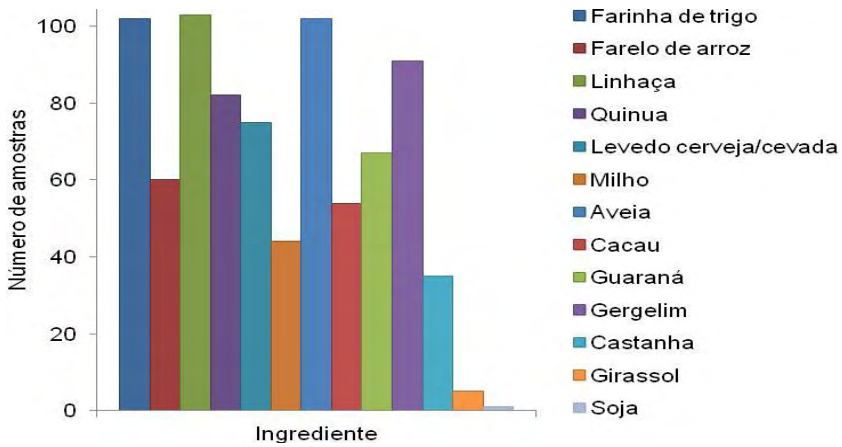

Figura 6. Caracterização dos ingredientes das 105 amostras adquiridas.

4.2 Atividade de água (Aa)

Os resultados encontram-se na Tabela 1. Nota-se que o produto apresenta baixa atividade de água, sendo a média de 0,51 ± 0,07. A maior parte das amostras (57,1%) encontrava-se na faixa entre 0,52 a 0,63. Doze amostras (11,4%) apresentaram valores de atividade de água ainda mais baixos, entre 0,32 e 0,41.

Tabela 1. Resultados de atividade de água nas amostras das misturas de cereais.

Atividade de água	Número de amostras	% de amostras
0,29 – 0,31	01	95,2
0,32 – 0,41	12	11,4
0,42 – 0,51	32	30,5
0,52 – 0,63	60	57,1
Total	105	100

A atividade de água é fundamental para a produção de micotoxinas, principalmente em substratos com baixa hidratação (MIDIO e MARTINS, 2000). De acordo com a FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO, 2013), o modo

correto de secagem é a melhor maneira de evitar crescimento de fungos e produção de micotoxinas em grãos após a colheita. Os fungos não podem crescer, nem as micotoxinas podem ser produzidas, em alimentos devidamente secos. Por isso a secagem eficiente dos produtos e a sua conservação sem umidade é uma medida eficaz contra o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas.

4.3 Avaliação da microbiota fúngica

Os resultados obtidos na avaliação da microbiota fúngica podem ser observados na Tabela 2. Oitenta e uma amostras (77,1%) apresentaram crescimento fúngico. A contagem média obtida no presente estudo foi de 3,57 ± 1,07 log UFC/g, com mínimo de 1,00 log UFC/g e máximo de 5,30 log UFC/g, sendo que este resultado se refere somente a bolores (Tabela 2). Cabe destacar que não houve crescimento fúngico em nenhuma das cinco amostras submetidas, segundo informação contida no rótulo, ao processo de irradiação.

Outros estudos avaliaram produtos similares: GRANADA et al. (2003) avaliaram sete marcas de granolas comercializadas em Pelotas/RS e encontraram bolores e leveduras variando de $1,2 \times 10^5$ a $3,7 \times 10^7$ unidades formadoras de colônias (UFC)/g. STELATO et al. (2010) encontraram contagens variando de < 10 a $7,9 \times 10^3$ UFC/g de bolores e leveduras em barras de cereais.

Tabela 2. Resultados parciais da contagem de fungos filamentosos nas amostras das misturas de cereais.

Log UFC/g	Número de amostras	% de amostras*	Contagem mínima (UFC/g)	Contagem máxima (UFC/g)
1,00 – 1,99	6	5,7	$1,0 \times 10^{1}$	
2,00 – 2,99	17	16,1		
3,00 – 3,99	25	23,8		
4,00 – 4,99	27	25,7		
5,00 – 5,99	6	5,7		2×10^{5}
Total	81	77,1%		

* Calculado sobre o total de 105 amostras.

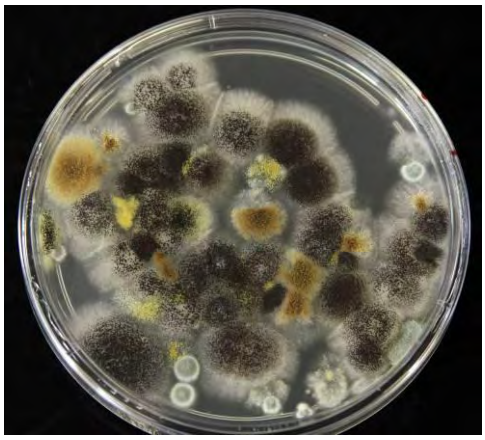

Figura 7. Colônias de fungos filamentosos de amostra na diluição 10^{-1}, em ágar DG18.

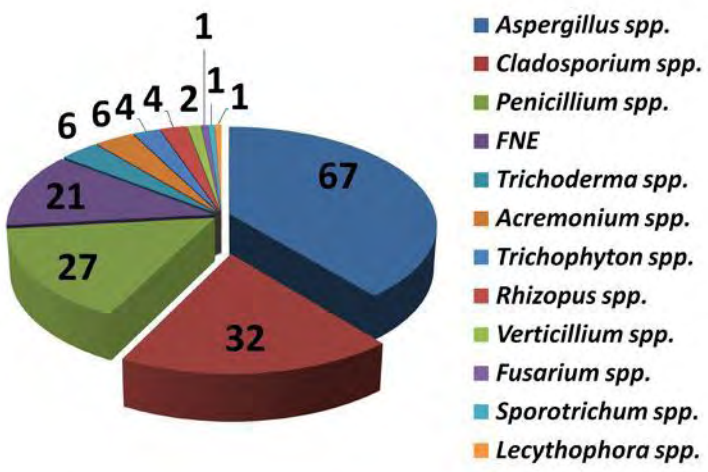

Figura 8. Frequência, em porcentagem, dos bolores isolados nas amostras.

Entre as 81 amostras que apresentaram crescimento fúngico, foram isoladas 268 colônias com diferentes características macroscópicas. Destas, 180 colônias foram identificadas ao microscópio ótico como *Aspergillus* spp., com destaque para os *Aspergillus* seção *Nigri*. Na Figura 8 encontram-se as porcentagens encontradas para cada tipo de bolor isolado nas amostras.

De acordo com PITT e HOCKING (2009), *Aspergillus* e *Eurotium* são mais significativos na composição da micoflora de armazenamento de cereais em condições tropicais do que as espécies de *Penicillium*. Para o *Aspergillus flavus*, as condições propícias para o crescimento incluem temperatura ótima de 33ºC, podendo ocorrer entre 10°C e 48°C (PITT e HOCKING, 2009). Ainda, a atividade de água mínima para o crescimento é de 0,78 a 0,80 (LEITÃO, 1988; LACEY et al., 1991).

De acordo com RODRIGUEZ-AMAYA (2001), a microbiota fúngica predominante em cereais inclui, geralmente, os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, os quais abrigam as principais espécies de fungos toxigênicos em alimentos. De fato, no presente estudo o gênero *Aspergillus* foi o mais prevalente, no

entanto, foi encontrado somente um isolado do gênero *Fusarium*. A alta frequência de *Cladosporium* spp. pode ser explicada por este gênero ser comumente encontrado no ambiente. GAMBALE (1998) afirmou que há uma alta ocorrência de *Cladosporium* spp. no ecossistema brasileiro, principalmente no ar e no solo. ZOPPAS et al. (2001), estudando a concentração de esporos deste fungo no ar atmosférico, encontrou concentrações de até 4.470 esporos/m^3.

SILVA e LOURENÇO JUNIOR (2009) detectaram alta porcentagem de fungos associados às sementes de quinua, sendo o gênero *Aspergillus* o mais detectado. Em pesquisa realizada por VECCHIA et al. (2007), verificou-se que em amostras de granola adquiridas em Porto Alegre, houve desenvolvimento de fungos de vários gêneros, entre os quais *Mucor circinelloides, Rhizopus* sp.*, Alternaria* sp., *Micelia sterilia* e também *Aspergillus, Fusarium* e *Penicillium.*

Somente uma colônia de *Fusarium* foi isolada das amostras avaliadas. A temperatura ótima de crescimento para o *Fusarium verticillioides* é de 25ºC, podendo variar de 2,5 a 37ºC, sendo que a atividade de água mínima para o crescimento é de 0,87 a 25ºC. No entanto, a atividade de água requerida para produção de FB_1 e FB_2 é de 0,92 (PITT e HOCKING, 2009).

As espéies de *Fusarium* são amplamente distribuídas em solos, particularmente em solos cultivados. Elas constituem a principal causa de deterioração de frutas e vegetais e são comumente associadas a cereais, os quais são invadidos na fase pré-colheita (PITT e HOCKING, 2009). Desta forma, o *Fusarium* sp. pode ser classificado como fungo de campo, exigindo alta umidade para o desenvolvimento, com produção de toxina no período pré-colheita. Como possui crescimento lento, não é capaz de competir com os fungos de

armazenamento, desaparece durante o armazenamento, restando apenas a toxina produzida durante o seu desenvolvimento (HIROOKA e YAMAGUCHI, 1994).

Para efetuar uma triagem, as colônias identificadas como *Aspergillus* (Figura 9) foram analisadas macroscopicamente, microscopicamente e repicadas em meio AFPA (Agar Aspergillus flavus e parasiticus). Em seguida, e de acordo com as características apresentadas, foram selecionadas 18 colônias, classificadas como *Aspergillus* seção *Flavi*, para avaliação de potencial toxigênico e identificação molecular das espécies.

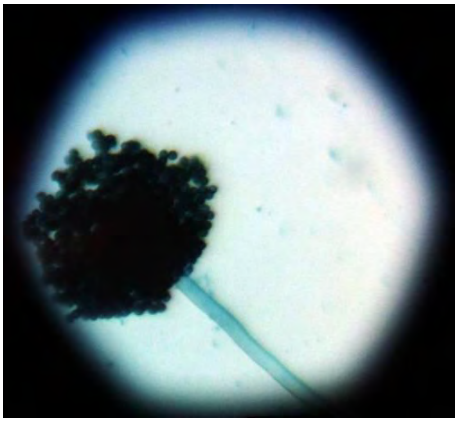

Figura 9. Fungo do gênero *Aspergillus* identificado ao microscópio ótico.

4.4 Avaliação do potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus* isoladas

Os procedimentos para a avaliação do potencial toxigênico (Figura 10) foram realizados nos isolados identificados previamente como pertencentes ao grupo *Aspergillus* seção *Flavi*.

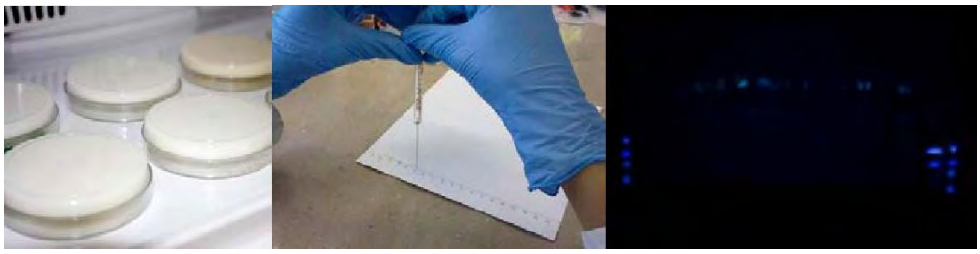

Figura 10. Etapas da análise de potencial toxigênico. A – Placas inoculadas e incubadas a 25°C; B– Preparo da cromatografia em camada delgada. C- Fluorescências observadas na cromatofolha.

Três colônias avaliadas produziram aflatoxinas, detectadas por cromatografia em camada delgada. Estas amostras foram submetidas à quantificação por CLAE, apresentando os seguintes resultados:

- AFB_1: 2.506 µg/kg; AFB_2: 29 µg/kg
- AFB_1: 5.445 µg/kg; AFB_2: 50 µg/kg
- AFB_1: 10.642 µg/kg; AFB_2: 454 µg/kg

As amostras com fungos produtores de aflatoxinas eram compostas por: arroz, soja, trigo, quinua, cerveja, gergelim, linhaça, aveia e milho; aveia, trigo, gergelim, levedo de cerveja, linhaça, goma guar, açúcar mascavo, cacau, farelo de maracujá, guaraná, quinua e soja; trigo, soja, aveia, quinua, linhaça, gergelim, levedo de cerveja, açúcar mascavo e guaraná.

LACEY et al. (1991) e PITT e HOCKING (2009) afirmam que para a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*, a atividade de água mínima deve ser estar entre 0,82 e 0,83. Para o crescimento, como mencionado anteriormente, a atividade de água mínima é de 0,78 a 0,80 (LEITÃO, 1988; LACEY et al., 1991). Como se pode observar na Tabela 1, nenhuma amostra avaliada apresentou valor de atividade de água superior a 0,63. Desta forma, a baixa atividade de água pode ter inibido o crescimento de cepas produtoras de aflatoxinas no produto.

4.5 Sequenciamento do DNA ribossomal das cepas de *Aspergillus* Seção Flavi isoladas

Das 18 colônias, inicialmente classificadas como *Aspergillus* seção *Flavi*, submetidas à análise de sequenciamento de um fragmento da região ITS, sete (38,9%) foram classificadas como *Aspergillus flavus* (Figura 11), seis como *Eurotium* sp., três como *Aspergillus tamarii*, um como *Aspergillus sydowii* e um como *Aspergillus versicolor*.

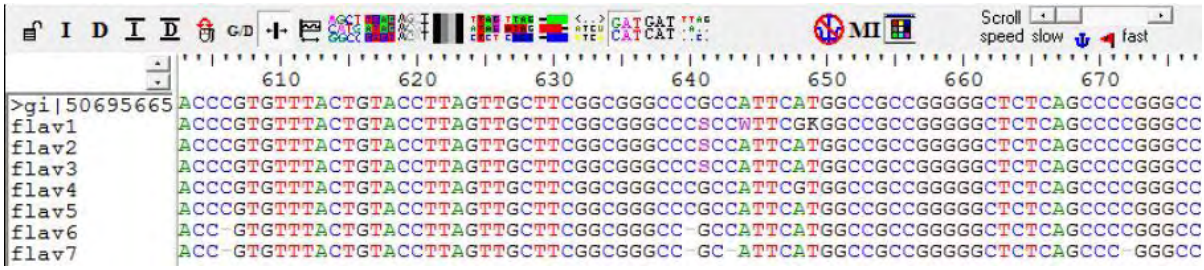

Figura 11. Alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas obtidas para a região ITS das cepas *Aspergillus flavus* isoladas nesse estudo, realizado com o programa ClustalW versão 1.4 com parâmetros em *default*. A amostra de referência utilizada foi *Aspergillus flavus* MGK1 gi|506956654|gb|KC911645.1|.

Estes resultados demonstram a importância das técnicas moleculares na identificação das espécies de fungos filamentosos, uma vez que a identificação somente ao microscópio exige muita experiência do analista.

Com relação ao baixo número de *Aspergillus flavus* isolados das amostras, as discussões nos itens anteriores quanto à atividade de água do produto e desenvolvimento dos fungos durante o armazenamento contribuem para a compreensão deste resultado.

4.6 Determinação de aflatoxinas

4.6.1 Curvas de calibração para aflatoxinas

O coeficiente de determinação (R^2) das curvas de AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2 foram 0,903, 0,973, 0,881 e 0,983, respectivamente. As curvas obtidas durante as análises podem ser observadas na Figura 12.

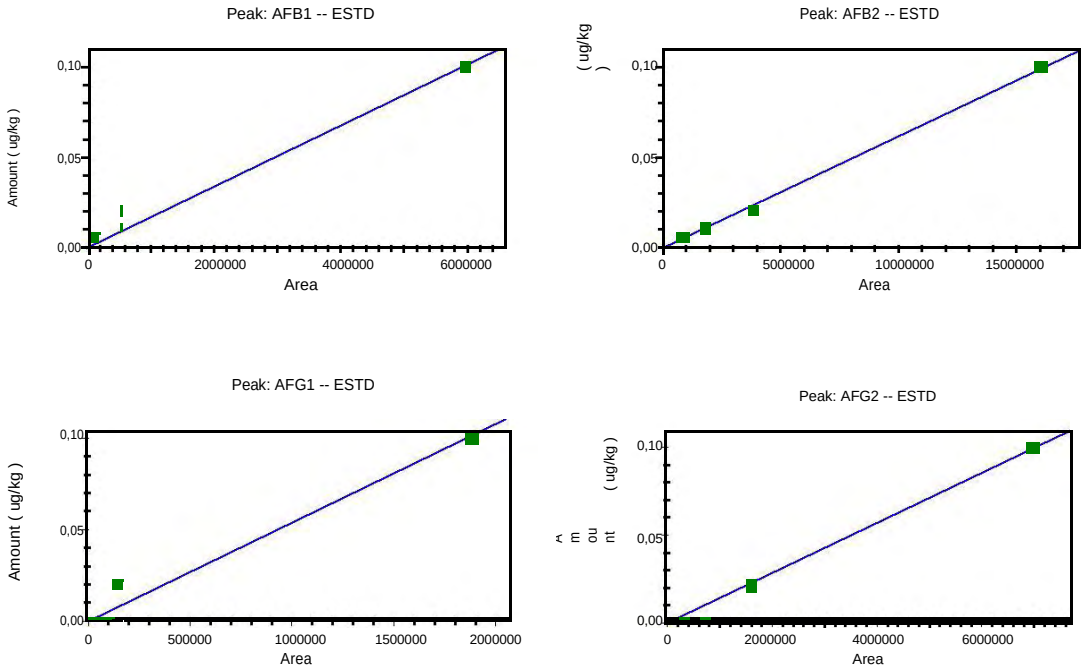

Figura 12. Curvas de calibração obtidas para as soluções padrão de (a) AFB_1 (coeficiente de correlação – r: 0,968), (b) AFB_2 (coeficiente de correlação – r: 0,996), (c) AFG_1 (coeficiente de correlação – r: 0,967), (d) AFG_2 (coeficiente de correlação – r: 0,998).

4.6.2 Avaliação do desempenho do método analítico para aflatoxinas

Os percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos a partir da fortificação, em triplicata, das amostras de misturas de cereais com as soluções padrão de aflatoxinas estão apresentados na Tabela 3. Os valores obtidos foram satisfatórios. O limite de detecção do método (aflatoxinas totais) foi de 0,08 µg/kg e o limite de quantificação foi 0,3 µg/kg.

Tabela 3. Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxinas em amostras de mistura de cereais.

AFB_1 Adicionada (µg/kg)	AFB_1 Observada (µg/kg)	AFB_1 Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
2,0	1,4 1,5 1,7	1,6	80	10
20,0	12 17 18	16,0	80	21
AFB_2 Adicionada (µg/kg)	AFB_2 Observada (µg/kg)	AFB_2 Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
2,0	1,1 1,8 1,3	1,4	70	26
20,0	13 24 17	18	90	31
AFG_1 Adicionada (µg/kg)	AFG_1 Observada (µg/kg)	AFG_1 Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)

2,0	1,6 2,1 2,2	2,0	100	16
20,0	19 22 15	19	95	19
AFG_2 Adicionada (µg/kg)	AFG_2 Observada (µg/kg)	AFG_2 Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
2,0	1,4 1,5 1,9	1,6	80	11
20,0	22 21 25	23	115	9

4.6.3 Detecção e quantificação de aflatoxinas

Os tempos de retenção para AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2 foram de 9,7, 20,3, 6,9 e 13,5 minutos, respectivamente. O cromatograma obtido para os padrões de aflatoxina contendo 0,1 µg/mL pode ser observado na Figura 13.

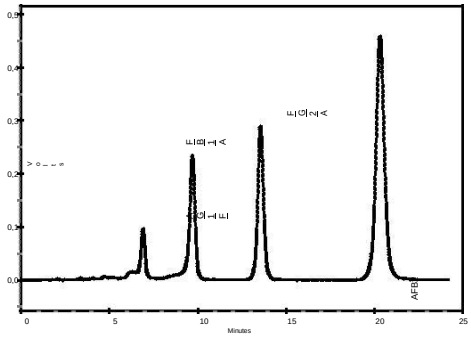

Figura 13. Cromatograma obtido para o padrão de aflatoxinas contendo 0,1 µg/mL.

A AFB_1 foi detectada apenas em 11 (10,5%) amostras avaliadas, com média de 0,38 ± 0,37 µg/kg. A AFG_1 foi detectada em apenas seis (5,7%) amostras, com média de 1,45 ± 1,46 µg/kg. AFB_2 e AFG_2 não foram detectadas.

Como mencionado anteriormente, LACEY et al. (1991) afirmam que para a produção de micotoxinas por *Aspergillus flavus* a atividade de água mínima deve ser

de 0,83. Desta forma, a baixa atividade de água da mistura de cereais pode ter inibido as possíveis cepas produtoras de aflatoxinas no produto.

Além disso, de acordo com o CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2013), a classificação, limpeza, moagem e processamento térmico (cozimento, assamento, torrefação, descascamento, extrusão) podem reduzir o conteúdo de aflatoxinas nos produtos alimentícios. A maioria dos ingredientes na composição das misturas de cereais é utilizada na forma de farinha ou farelo, ou seja, após processamentos.

Outra explicação poderia ser a alta ocorrência de *Aspergillus* seção *Nigri*. De acordo com HORN e WICKLOW (1983) e PASTER et al. (1992), o *Aspergillus niger* inibe a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus.*

4.7 Determinação de fumonisinas

4.7.1 Construção das curvas de calibração para fumonisinas

O coeficiente de determinação (R^2) das curvas de FB_1 e de FB_2 foram 0,9987 e 0,9967, respectivamente. As curvas obtidas durante as análises podem ser observadas na Figura 14.

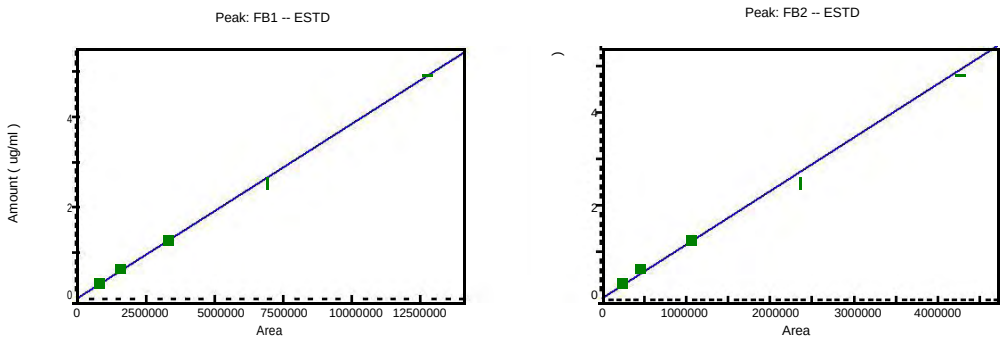

Figura 14. Curvas de calibração obtidas para as cinco soluções padrão de (a) FB_1 (coeficiente de correlação – r: 0,998689) e de (b) FB_2 (coeficiente de correlação – r: 0,99669).

4.7.2 Avaliação do desempenho do método analítico para fumonisinas

Os percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos a partir da fortificação, em triplicata, das amostras de misturas de cereais com as soluções padrão de fumonisinas estão apresentados na Tabela 4. As recuperações médias obtidas para FB_1 e FB_2 nos níveis 100 µg/kg e 1.000 µg/kg foram de 103% e 92%, e 70% e 69%, respectivamente, valores que pode ser considerados satisfatórios de acordo com HORWITZ (1982). O limite de detecção do método foi de 2 µg/kg e o limite de quantificação foi 10 µg/kg, considerando uma quantidade mínima de toxina que poderia gerar um pico cromatográfico cinco vezes maior sobre a taxa de altura/ruído da linha de base.

Tabela 4. Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de FB_1 em amostras de mistura de cereais.

FB_1 Adicionada (µg/kg)	FB_1 Observada (µg/kg)	FB_1 Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
100	90 70 149	103	103	39
1.000	940 1.040 790	923	92	14
FB_2 Adicionada (µg/kg)	FB_2 Observada (µg/kg)	FB_2 Média (µg/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
100	71 60 79	70	70	14
1.000	740 800	690	69	21

530

4.7.3 Detecção e quantificação de fumonisinas

Os tempos de retenção para FB_1 e FB_2 foram de 10,2 e 27,5 minutos, respectivamente. O cromatograma obtido para o padrão de FB_1 e FB_2 contendo 500 µg/kg pode ser observado na Figura 15.

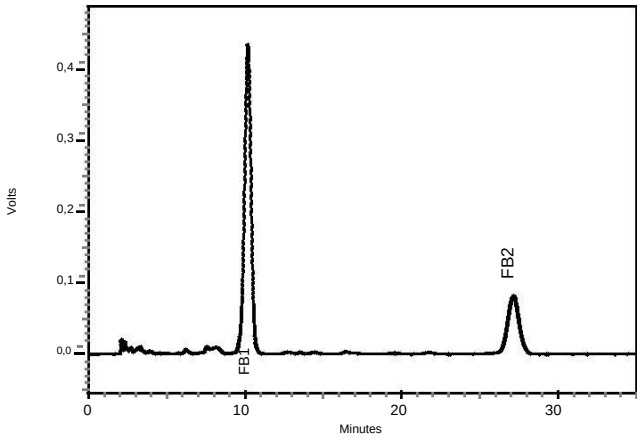

Figura 15. Cromatograma obtido para o padrão de FB_1 e FB_2 contendo 500 µg/kg.

Dezenove amostras (18,1%) apresentaram FB_2, com níveis variando de 2 a 2.366 µg/kg (Tabela 5). Pode-se observar também que 89 (84,8%) amostras apresentaram FB_1, sendo que quatro apresentaram níveis acima de 500 µg/kg (634, 703, 1.269, 1.876 µg/kg). Quatorze amostras (13,3%) apresentaram FB_1 e FB_2. A média de FB_1 nas amostras positivas foi de 137,8 ± 257,4 µg/kg, enquanto que a de FB_2 foi de 287,63 ± 585,59 µg/kg.

Os níveis máximos de fumonisinas (FB_1 + FB_2) permitidos pela legislação brasileira, a partir de 2016, serão de 1.500 µg/kg para farinha de milho e de 1.000 µg/kg para outros produtos à base de milho (ANVISA, 2011). Assim, a amostra contendo 1.876 µg FB_1/kg + 2.366 µg FB_2/kg apresentou níveis excedendo o limite máximo citado.

Dentre os cereais que constituem as misturas de cereais, o milho é conhecido como uma das principais fontes de contaminação das fumonisinas. Das 105 amostras analisadas, o milho estava presente em 39 (37,1%) e destas amostras, 35 foram contaminadas com FB_1. No entanto, 53 (50,5%) amostras sem milho declarados na composição apresentaram FB_1. Deve-se ressaltar que o presente trabalho não avaliou a composição das misturas, contando apenas com as informações do fabricante, constantes no rótulo.

No campo, para as *commodities* trigo, centeio, cevada e aveia, enquanto o *Fusarium* é eliminado durante o processamento do alimento, uma quantidade significativa de micotoxinas é carreada, sendo resistentes à limpeza e seleção dos grãos, moagem, cozimento e outros processamentos (FRISVAD et al., 2007).

Tabela 5 – Fumonisinas em amostras de mistura de cereais.

	FB_1 (µg/kg)		FB_2 (µg/kg)	
	Número de amostras	% de amostras	Número de amostras	% de amostras
< 2	16	15,2	86	81,9
2 – 49	36	34,2	9	8,6
50 – 99	25	23,8	3	2,9
100 - 199	15	14,3	2	1,9
200 - 299	05	4,8	1	1,0
300 - 399	02	1,9	0	0
400 - 499	02	1,9	1	1,0
500 - 999	02	1,9	1	1,0
> 1.000	02	1,9	2	1,9
Total	105	100	105	100

ND: não detectado. LOD: 2 µg/kg; LOQ: 10 µg/kg.

Estudos brasileiros que investigaram fumonisinas se referem principalmente a produtos de milho. BITTENCOURT et al. (2005) avaliaram 60 amostras de farinha e fubá de milho comercializados no Estado de São Paulo e encontraram FB_1 variando de 1.100 a 15.300 µg/kg (média de 5.200 µg/kg) em farinha de milho. A farinha de milho apresentou os menores níveis de FB_1 (500 a 7.200 µg/kg, média: 2.100 µg/kg). Outro estudo no Estado de São Paulo reportou contaminação por FB_1 em 83,3% de milho em grão, 95,8% de farelo de milho e 100% das amostras de farinha de milho, com nível máximo de 6.857 ng/g em farinha de milho (MYIAMOTO et al., 2008). Um estudo com 196 amostras de alimentos infantis à base de milho no Estado de São Paulo revelou nível médio para fumonisinas totais (B_1, B_2, B_3) de 2.242 µg/kg (máximo de 8.039 µg/kg) em farinha de milho (CASTRO et al., 2004).

Em três regiões do Estado de Santa Catarina, amostras de milho destinados ao consumo humano revelaram níveis de 3,2, 3,4 e 1.700 µg/kg para fumonisinas totais (VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003). No mesmo Estado, SCAFF e SCUSSEL (2004) encontraram 92,7% de produtos de milho contaminados com fumonisinas. A farinha de milho apresentou o mais alto nível de contaminação (91,5%), variando de 3.811 a 5.737 µg/kg. Em Pernambuco, um estudo avaliando FB_1 em 74 amostras de produtos de milho mostrou 94,6% de amostras contaminadas, em concentrações que variaram de 20 a 8.600 µg/kg (KAWASHIMA e VALENTE SOARES, 2006).

Alguns dos outros ingredientes das misturas de cereais foram analisados quanto à presença de outras micotoxinas. É sabido que a cevada, ingrediente de muitos tipos de misturas de cereais, pode também apresentar micotoxinas. Fusariotoxinas foram avaliadas em cevada por MALACHOVA et al. (2010), observando-se a contaminação com desoxinivalenol em 83% das amostras. No

entanto, não foram avaliadas as fumonisinas. NUNES et al. (2003) avaliaram grãos de arroz e relatadas contaminação por zearalenona. CARVALHO et al. (2010) relataram baixa incidência de aflatoxinas em arroz. A contaminação por aflatoxinas em farinha de aveia e farelo de trigo foi investigada por MOREIRA et al. (2003), que encontraram 8% das amostras de farinha de aveia com AFG_1 (2,5 µg/kg) e 20% de farelo de trigo com aflatoxina B_2 (2-4 µg/kg). CALORI-DOMINGUES et al. (2007) observaram elevada ocorrência de desoxinivalenol em trigo produzido no Brasil (94% das amostras) e outros países (88% das amostras), com uma média de 90 e 332 µg/kg, respectivamente. De 333 amostras de soja, 15,01% apresentaram aflatoxinas, com máximo de 33 ng/g (MURMANN et al., 2003). No Reino Unido, 24% dos cereais matinais apresentaram fumonisinas totais variando 11-194 µg/kg (PATEL et al., 1997).

Há uma recomendação do Comité FAO / OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA) para um consumo máximo tolerável diário de 2 mg/kg de peso corporal (pc) para fumonisinas B_1, B_2 e B_3, sozinha ou combinadas (JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 2001). Não há dados no Brasil sobre o consumo diário de misturas de cereais. No entanto, os fabricantes recomendam o consumo de 20 g por dia. Considerando-se esta ingestão e o nível máximo obtido neste estudo (4.242 µg/kg), a ingestão diária seria de 84,8 mg de FB_1 (4.242 µg/kg x 20 g), o que levaria a uma ingestão diária máxima provável (PDIM) de 1,21 mg/kg de peso corporal por dia, considerando-se indivíduos com 70 kg de peso corporal (25% da ingestão diária máxima tolerável).

4.8 Ocorrência simultânea de aflatoxinas e fumonisinas nas amostras

A ocorrência simultânea de duas ou mais micotoxinas em um alimento pode conduzir à potencialização de seus efeitos tóxicos sobre o consumidor. Neste estudo, 22 amostras (21%) apresentaram mais de uma micotoxina, sendo três (2,86%) com AFB_1 e AFB_2, 14 (13,3%) com FB_1 e FB_2, cinco (4,76%) com AFB_1 e FB_1 e uma amostra (0,95%) com AFB_1, AFB_2, FB_1 e FB_2.

GARRIDO et al. (2010) estudaram a ocorrência de micotoxinas em milho entre os anos de 1999 e 2000 e constataram uma contaminação por fumonisinas de 90 a 100% em todos os anos, com co-ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em 8,4% das amostras e de zearalenona e fumonisinas em 2%. VARGAS et al. (2001) analisaram a co-ocorrência de micotoxinas em 214 amostras de grãos de milho e constataram que 38,3% e 99,1% delas apresentaram AFB_1 e FB_1, respectivamente, sendo que todas as amostras contaminadas com AFB_1 também estavam contaminadas com FB_1. A presença simultânea de AFB_1, zearalenona e FB_1, e de AFB_1, AFB_2 e FB_1 foi encontrada em 8,4 e 20,1% das amostras, respectivamente. ONO et al. (2001) também encontraram resultados similares, com 98% das amostras analisadas positivas para fumonisinas (0,096 a 22,6 mg/g) e 11,3% para aflatoxinas (38,0 a 460,0 µg/kg). Todas as contaminadas com aflatoxinas estavam contaminadas com fumonisinas.

Amostras de cereais foram avaliadas para diferentes micotoxinas, apresentando 41 % das amostras positivas para FB_1, 51% para aflatoxinas, 57% para zearalenona, 65% para desoxinivalenol e 3% para ocratoxina A. A maioria das amostras (79%) continha mais que uma micotoxina, sendo mais comum a co-ocorrência de FB_1, zearalenona e desoxinivalenol (21%), principalmente no milho. A

ocorrência de quatro micotoxinas, FB_1, zearalenona, desoxinivalenol e aflatoxina, foi encontrada em 11% das amostras. Embora as amostras tenham apresentado níveis individuais de micotoxinas bastante baixos, a ocorrência simultânea pode gerar efeito aditivo ou sinérgico nos humanos, comprometendo a saúde (NJOBEH et al., 2010).

5 CONCLUSÕES

A contagem de bolores nas amostras avaliadas variou de $1,0 \times 10^1$ a 2×10^5 UFC/g, com isolamento e identificação de somente sete cepas de *Aspergillus flavus.* As aflatoxinas B_1 e G_1 foram detectadas em poucas amostras e em baixos níveis, sendo que estes resultados podem ser devidos à baixa atividade de água nos produtos avaliados, a qual foi inferior a 0,63. A fumonisina B_1 foi detectada em 84,8% das amostras, no entanto, a ingestão diária provável calculada para as fumonisinas esteve abaixo da recomendação do JECFA. Apenas uma amostra apresentou níveis de fumonisinas acima do limite esperado para 2016.

Adicionalmente, foi observado que 21% das amostras apresentaram mais de um tipo de micotoxina, o que poderia conduzir à potencialização de efeitos tóxicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H. K. Aflatoxin and food safety. In: SCHEIDEGGER, K. A.; PAYNE, G. A. **Unlocking the secrets behind secondary metabolism**: a review of Aspergillus flavus from pathogenicity to functional genomics. North Carolina: CRC Press, 2005. cap. 8, p. 143-144.

ABDOLLAHI, A.; BUCHANAN, R. L. Regulation of aflatoxin biosynthesis: induction of aflatoxin production by various carbohydrates. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 46, p. 633-635, 1981.

ABRIL. Ração humana. Disponível em:<http://www.abril.com.br/saude/racao-humana>. Acesso em: 27 nov. 2010.

AGAG, B. I. Mycotoxins in foods and feeds: aflatoxins. **Assiut University Bulletin for Environmental Researches**, Egypt, v. 7, n. 1, Mar. 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev. 2011. Seção 1, p. 72-73.

AL TECH. **Contaminantes em rações**. Disponível em:< www.pt.altech.com>. Acesso em: 10 jan. 2013.

ALLCROFT, R.; CARNAGHAM, R. B. A. Groundmet toxicity Aspergillus flavus toxin (aflatoxin) in animal products - preliminary communications. **Veterinary Record**, London, v. 74, p. 863-864, 1962.

ALTSCHUL, S. F. et al. BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research,** Oxford, v. 25, p. 3389–3402, 1997.

ANDRADE, J. M. S.; LIMA, M. L. P. **Aspectos gerais e morfológicos de "Aspergillus flavus**". Disponível em < http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/10/descricao-micologica-aspectos-gerais-e_25.html>. Fitopatologia, 2010.

ASPLIN, F. D.; CARNAGHAN, R. B. A. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. **Veterinary Record**, London, v. 46, p.1215-1219, 1961.

BENNET, J. W. Aspergillus: a primer for the novice. **Medical Mycology**, Oxford, v. 47, Suppl. 1, p. S1-S8, 2009.

BERJAK, P. Stored seeds: the problem caused by microorganisms (with particular reference to the fungi). In: NASSER, L. C.; WENTZEL, M. M.; FERNANDERS, J. M. (Eds.) **Seed Pathology International**: advanced course. Brasília, DF: Abrates, 1987. p. 38-50.

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

BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from Fusarium moniliforme. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communication,** Cambridge, v. 11, p. 743-745, 1988.

BHAT, R. V.; MILLER, J. D. Mycotoxins and food supply. **Food Nutrition and Agriculture,** Rome, v. 1 p. 27-31, 1991.

BITTECOURT, A. B. F. et al. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control,** Kidlington, p.117–120, 2005.

BLOUNT, W. P. Turkey "X" disease. **Turkeys**, Yorks, v. 9, n. 2, p. 52-67, 1961.

BOZZA, A. **Detecção e quantificação de ocratoxina a produzida por espécies de Aspergillus isoladas de grãos de café**. 2010. 144 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2010.

BUCHI, G. et al. Aflatoxin Q1: a major metabolite of aflatoxin B1 produced by human liver. **Research Communications Chemical in Pathology Pharmacology,** Westbury, v. 8, p. 585, 1974.

BULLERMAN, L. B. Occurrence of Fusarium and fumonisins on food grains and in foods. **Advances in experimental medicine and biology,** New York, v. 32, p. 27-38, 1996.

BULLERMAN, L. B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **Journal Food Protection,** Des Moines, v. 42, n. 1, p. 65-86, 1979.

BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H.; ADAMS, D. M. Colony count methods. In: SPECK, M. L. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of methods for the microbiological examination of foods**. New York: American Public Health Association, 1984. 914 p.

CALORI-DOMINGUES, M. A. et al. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia Alimentos,** Campinas, v. 27, p. 181-185, 2007.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE -SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A rewiew on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, Kidlington, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CARVALHO, R. A. et al. Incidência de fungos toxigênicos e aflatoxinas em arroz. **Ciência e Agrotecnologia,** Lavras, v. 34, n. 4, p. 946-952, 2010.

CASTRO, M. F. et al. Fumonisins in Brazilian corn-based foods for infant consumption. **Food Additives and Contaminants,** Oxfordshire, v. 21, p. 693-699, 2004.

CASTRO, M. F. P. M.; SOARES, L. M. V.; FURLANI, R. R. Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvest corn (Zea mays L.): a preliminary study. **Revista Microbiológica,** v. 26, p. 289-295, 1995.

CHANG, Y. S. et al. Human aortic proteoglycans of subjects from districts of high and low prevalence of atherosclerosis in China. **Atherosclerosis,** Shannon, v. 31, p. 9-15, 1991.

CIRIO G. M.; LIMA, M. L. R. Z. C. Métodos de detecção do gênero Aspergillus em sementes de milho (Zea mays l.) em 270 dias de armazenamento, **Visão Acadêmica**, Curitiba/PR, v. 4, n.1, p. 19-23, Jun. 2013.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Discussion paper on aflatoxins in cereals. CX/CF 13/7/18 February, 2013. 17 p. Disponível em < ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf7/cf07_18e.pdf >.

COLE, R. J. et al. Mean geocarposphere temperature that induce preharvest aflatoxin contamination of peanuts and drought stress. **Mycopathologia,** Dordrecht, v. 91, p. 41-46, 1985.

COSTA, F. M. P. Severidade de **Phaesphaeria maydes e rendimento de grãos de milho (Zea mays L) em diferentes ambientes e doses de nitrogênio**. 2001. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. (Eds.). **Mycotoxins and phytoalexins**. London: CRC Press, 1991. p. 103-144.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). **Mycotoxins**: risks in plant, animal and human systems. Iowa, USA: Task Force, 2003. n. 139.

DALEZIOS, J. I.; HSIEH, D. P. H.; WOGAN, G. N. Excretion and metabolism of orally administered aflatoxin B1 by Rhesus monkeys. **Food and Cosmetics Toxicology,** Kidlington, v. 11, n. 4, p. 605-616, 1973.

DEGOLA, F. et al. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of Aspergillus flavus. **Journal of Applied Microbiology,** West Sussex, v. 103, p. 409–441, 2007.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Veterinary and Human Toxicology,** Manhattan, v. 36, n. 6, p. 548-555, 1994.

DINIZ, S. S. S. Micotoxinas. Campinas/SP: Livraria e Editora Rural. 2002. p. 20-56.

DOOHAN, F. M.; BRENNAN, J.; COOKE, B. M. Influence of climatic factors on Fusarium species pathogenic to cereals. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.109, p. 755-768, 2003.

EHRLICH, V. et al. Fumonisin B1, is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells mutagenesis. **Mutagenesis**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 257-260, 2002.

EINLOFT, T. C.; HOELTZ, M.; NOLL, I, B. Aflatoxina B1 em amendoim e produtos derivados comercializados na cidade de Porto Alegre. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PUCRS, 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Faculdade de Biociências, PUCRS, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRGS, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Colheita, Beneficiamento e Armazenamento Disponível em: < www.embrapa.br >. Acesso em: 10 jan. 2013.

ETZEL, R. A. Mycotoxins. **JAMA**, Chicago, v. 287, n. 4, p. 425-427, Jan. 2002.

FANDOHAN, P. et al. Natural occurrence of Fusarium and subsequent fumonisin contamination in Preharvest and stored maize in Benin, West Africa. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 2, p. 173-183, 2005.

FINCHAM, J. E. et al. Micotoxinas em grãos. **Food Chemistry,** Amsterdam, v. 39, p. 109-111, 1991. Disponível em:<http://www.fao.org/wairdocs/x5012o/x5012o01.htm>. Acesso em: 19 jul. 2013.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, P.C.; **Microbiologia de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 1993. p. 229.

FRISVAD, J. C.; ANDRESEN, B.; SAMSON, R. Association of moulds to foods. In: DIJKSTERHUIS, J.; SAMSON, R.A. (Eds.). **Food mycology:** a multifaceted approach to fungi and food. Florida: CRC Press, 2007. 403 p.

GAMBALE, W. Fungos contaminantes. In: ZAITZ, C. et al. (Ed.). **Compêndio de micologia médica**. São Paulo: Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 1998. p. 113-121.

GARRIDO, C. E.; HERNANDEZ-PEZZANI, C.; PACIN, A. Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (Zea mays L.), from 1999 to 2010. **Food Control**, Kidlington, v. 25 n. 2, p. 660-665, 2010.

GEISEN, R. PCR methods for detection of mycotoxin: producing fungi. In: BRIDGE, P.D. et al. (Eds.). **Aplications of PCR in mycology**. 2nd ed. Cambrige: University Press, 2000. p. 242-263.

GLENN, A. E. Mycotoxigenic fusarium species in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 213–240, 2007.

GRANADA, G. et al. Caracterização de granolas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 87-91, 2003.

GRIFFIN, H. D. **Fungal physiology**. 2. ed. New York: John Willey & Sons, 1994.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series,** Oxford, v. 41, p. 95–98, 1999.

HENRY, M. H.; WYATT, R. D.; FLETCHER, O. J. The toxicity of purified fumonisin B1 in broiler chicks. **Poultry Science**, Savoy, v. 79, n. 10, p. 1378-1384, 2000.

HIROOKA, E. Y. et al. The natural occurrence ofumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, Oxfordshire, v. 13, p. 173–183, 1996.

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

HORN, B. W.; WICKLOW, D. T. Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by Aspergillus niger. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 1087-1091, 1983.

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry,** Rajkot, v. 54, p. 67A-76A, 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Lavouras**. Disponível

em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201006comentarios.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2011.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans and their supplements**: a complet list, some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, International Agency for Search on Cancer, Lyon: World Health Organization, 2002.

JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. In: 56th MEETING OF THE JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 56., 2001, Geneva. **Abstratcs…** Geneva: World Health Organization, 2001. (WHO Food Additives Series No. 47)

JURGENSON, J. E.; ZELLER, K. A.; LESLIE, J. F. Expanded genetic map of Giberella moniliformis (Fusarium verticillioides). **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 68, p. 1972-1979, 2002.

KAWASHIMA, L. M.; VALENTE SOARES, L. M. Incidência de fumonisina B_1, aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia Alimentos,** Campinas, v. 26, p. 516-521, 2006.

KLICH, M. A. **A identification of common Aspergillus species**. Netherlands: CBS, 2002.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guid to common aspergillus species and their telemorphs**. North Ryde: CSIRO, 1988. 116 p.

KPODO, K.; THRANE, U.; HALD, B. Fusaria and fumonisins in maize from Ghana and their coocurrence with aflatoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 2-3, p. 147-157, 2000.

LACEY, J.; MAGAN, N. Fungi in cereal grain: their occurrence and water and temperature relations. In: CHELKOWSKI, J. (Ed). **Cereal grain**: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Amsterdam: Elsevier Science, 1991. p. 77-118.

LACEY, J. et al. Grain fungi. In: DILIP, K. (Eds.). **Handbook of applied microbiology**: foods and feeds. New York: Marcel Dekker, p. 12-77, 1991.

LEITÃO, J. et al. Quantitation of aflatoxins from various strains of Aspergillus in foodstuffs. **Journal Chromatography,** Amsterdam, v. 435, p. 229- 234, 1988.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by Aspergillus spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, p. 1466-1469, 1976.

LINK, H. F. Observationes in ordines plantarum naturals, Dissetatio **I. Mag. Ges. Naturf,** Freunde Berlin, v. 3, 3–42, 1809.

LUZ, W. C. Diagnose e controle de doenças da espiga de milho no Brasil. **Circular Técnica**. Passo Fundo, n. 5, p.1-2, 1995.

MACKENZIE, D. W. R. Reynote lecture: Aspergillus in man. In: VANDEN BOSSCHE, H. et al. (Ed.). **Aspergillus and Aspergilosis**. New York: Plenum Press, 1988. p. 332.

MALACHOVA, A. et al. Fusarium mycotoxins in various barley cultivars and their transfer into malt. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** West Sussex, v. 90, p. 2495-2505, 2010.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Agricultura**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br >. Acesso em: 10 jan. 2013.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Effect of water activity on hydrolytic enzyme production by Fusarium moniliforme and Fusarium proliferatum during colonization of maize. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, p.185-194, 1998.

MASCARENHAS, P. et al. Postharvest spoilage of mango (Mangifera indica) by Botryodiplodia theobromae. **Mycological Research,** Cambridge, v. 100, n. 1, p. 27-30, 1995.

MASRI, S. et al. Aflatoxin Q1: a newly identified major metabolite of aflatoxin B1 in monkey liver. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 22, n. 3, p. 512-515, 1974.

McLEAN, M.; DUTTON, M.F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. **Pharmacology and Therapeutics,** Philadelphia, v. 65, p. 163-92, 1995.

MENTEN, J. O. M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: _____. **Patógenos em sementes**: detecção, danos e controle químico. São Paulo: CibaAgro, 1991. p. 115-136.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. Varela: São Paulo, 2000, 295 p.

MILLS, J. T. Insects-fungus associations influencing seed deterioration. Phytopathology. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 2, p. 330-335, 1983.

MILLS, J.T. Ecology of mycotoxigenic Fusarium species on cereal seeds. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 52, p. 737-742, 1989.

MOREIRA, N. A. et al. Aflatoxinas, contaminação fúngica e teor de umidade em produtos utilizados como fonte de fibra alimentar. **Higiene Alimentar,** Mirandópolis, v. 17, p. 94-96, 2003.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology,** West Sussex, v. 84, p. 62S-76S, 1998.

MURMANN, L. et al. Avaliação dos índices de aflatoxinas em soja. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 5., 2003, Campinas. **Anais...** Campinas, 2003.

MYIAMOTO, J. A. et al. Quantificação de fumonisinas em produtos à base de milho na região de Pirassununga, Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8., 2008, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro, 2008.

NAIR, M. G. Fumonisins and human health. **Annals of Tropical Paediatrics**, Leeds, v. 18, Suppl., p. S47-S52, 1998.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan, 1979. 839 p.

NJOBEH, P. B. et al. Simultaneous occurrence of mycotoxins in human food commodities from Cameroon. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 26, n. 1, p. 47-57, 2010.

NORRED, W. P. et al. In vitro toxicology of fumonisins and the mechanistic implications. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 73-78, 1992.

NUNES, L. I. et al. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas,** v. 23, p. 190-194, 2003.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION. **Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins**. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:050:0008:0012:EN:PDF>, Acesso em: 20 nov. 2013.

ONO, E. Y. S. et al. Microbiota fúngica em amostras de milho da região sul do Paraná. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 21., 1996, Londrina. **Anais...** Londrina, 1996. P. 2296

ONO, E. Y. S. et al. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Additives and Contaminants,** Oxfordshire, v.18, n. 8, p. 719-729, 2001.

PASTER, N.; PUSHINSKY, A.; MENASHEROV, M. Inhibitory effect of Aspergillus niger on the growth of Aspergillus ochraceus and Aspergillus flavus, and on aflatoxin formation. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** West Sussex, v. 58, n. 4, p. 589-591, 1992.

PATEL, S. et al. Surveillance of Fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. **Food Additives and Contamination**, Oxfordshire, v.14, n. 2, p.187-191, 1997.

PITT, J. I. (Eds.). **Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification**. Hardwood: Academic Publishers Reading, 2000. p. 51-72.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3rd ed Heidelberg: Springer, 2009. 519 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; GLENN, D. R. An improved medium for the detection of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. **Journal of Applied Bacteriology**, West Sussex, v. 54, N. 1, p. 109-114, 1983.

POZZI, C. R. et al. Post- harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. **Food Additives and Contaminants,** Oxfordshire, v. 12, n. 3, p. 313-319, 1995.

PRELUSKY, D. B. et al. Biological fate of fumonisins B1 in food-producing animals. In: JACKSON, L.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (Eds.). **Fumonisins in food**: advances in experimental medicine and biology. New York: Plenum Press, 1996. v. 392, cap. 23, p. 265-278.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Glossário ilustrado de micologia**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 2000. 660 p.

REDDY, R. V.; JOHNSON, G.; ROTTINGHAUS, G. E. Developmental effects of fumonisin B1 in mice. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 134, p. 161-166, 1996.

RHEEDER, J. P. et al. Fusarium moniliforme and fumonisins in corn and in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology,** St. Paul, v. 82, n. 3, p. 353-357, 1992.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia,** Lawrence, v. 42, n. 2, p. 265-70, 1950.

RILEY, R. T. et al. Fumonisins: mechanism of mycotoxicity. **Revue de Medecine Veterinaire,** Toulouse, v. 149, n. 6, p. 617-626, 1998.

RODRICKS, J. V.; STOLOFF, L. Aflatoxin residues from contamined feed in edible tissues of food: producing animals. In: RODRICKS, J. V.; HESSELTINE, C. W.; MEHLMAN, M. A. (Eds.). **Mycotoxins and animal health**. Illinois: Park Forest Hills, 1987. p. 67-79.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Occurrence of mycotoxins and mycotoxin-producing fungi in Latin America. In: KOE, W. J. (Eds.). **Mycotocins and phycotoxins in**

perspective at the turn of the millenium. Netherlands: W. J. De Koe, 2001. p. 309-320.

ROSMANINHO, J. F; OLIVEIRA C. A. F; BITTENCOURT, A. B. F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. **Arquivos do Instituto Biológico,** São Paulo, v. 68, n. 2, p. 107-114, jul./dez. 2001.

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

SANTURIO, J. M. Impacto das aflatoxinas sobre a produção animal. Perspectiva Latinoamericana. In: CONFERENCIA APINCO DE CIENCIA E TECNOLOGIA AVICOLA, 1996, Campinas. **Anais…** Campinas: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. p. 149-156.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2000.

SCAFF, R. M. C.; SCUSSEL, V. M. Fumonisins B_1 and B_2 in corn-based products commercialized in the state of Santa Catarina - Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** Curitiba, v. 47, n. 6, 2004.

SCOTT, P. M. Natural poisons. In: Helrich, K. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1990. p.1184-1213.

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

SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. Introduction of mycotoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. (Eds.). **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 775 p.

SHEPHARD, G. S. Chromatography determination of the fumonisin mycotoxins. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 815, n. 1, p. 31-39, 1998.

SILVA, A. P.; LOURENÇO JÚNIOR, V. Ocorrência de fungos em sementes de cinco linhagens brasileiras de quinoa. **Campo Digital**, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 137-141, 2009.

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

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA (SNA). Safra de grãos 2011/2012: recorde de 165,9 milhões de toneladas. Disponível em: < http://sna.agr.br > Acesso em: 10 jan. 2013.

STELATO, M. M. et al. Contaminação fúngica em barras de cereais comercializadas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, p. 285-920, 2010.

STEVENS, A. J. et al. Investigations into diseases of turkey poults. **Veterinary Record,** London, v. 72, n. 31, p. 627-628, 1960.

ST-GERMAIN, G.; SUMMERBELL, R. Identifying Filamentous Fungi. A Clinical Laboratory Handbook. Star Publishing Company. Ed. 1; 314p.; 1996.

SYDENHAM, E. W.; GELDERBLOM, W. C. A.; THIEL, P. G. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B1 a mycotoxin produced by Fusarium moniliforme in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, p. 2014-2018, 1991.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. D. A. **Fungos em alimentos**: ocorrência e detecção. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 2001. 82 p.

THIEL, P. G.; SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W. Levels of fumonisins B1 and B2 in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 39, p. 109-111, 1991.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 24 p. 4876–4882, 1994.

VAN DER WESTHUIZEN, L. et al. Fumonisin contamination and Fusarium incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 51, n. 18, p. 5574-5578, 2003.

VARGAS, E. A. et al. Co -occurrence of aflatoxins B_1 , B_2, G_1, G_2, zearalenone and fumonisin B_1 in Brazilian corn. **Food Additives and Contaminants**, Oxfordshire, v. 18, n. 11, p. 981-986, 2001.

VECCHIA, A. D.; CASTILHOS-FORTES, R. Contaminação fúngica em granola comercial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27 n. 2 p. 324-327, 2007.

VINCELLI, P.; PARKER, G. Fumonisin, vomitoxin and other mycotoxins in corn produced by Fusarium fungi. In: **Cooperative Extension Service**. Frankfurt: University of Kentucky, College of Agriculture, 2002.

WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with Fusarium moniliforme. **Journal of Biological Chemistry,** Bethesda, v. 266, n. 22, p. 14486-14490, 1991.

WIDIASTUTI, R. et al. Corn as a source of mycotoxins in Indonesian poultry feeds and the effectiveness of visual examination methods for detecting contamination. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 102, n. 1, p. 45-49, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Mycotoxins environmental health criteria**. Geneva: WHO, 1979. v. 11, p. 21-84.

XAVIER, J. G. et al. Equine leukoencephalomalacia: report of five cases Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 185-189, 1991.

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J. P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research,** France, v. 51, p. 81-99, 2002.

ZOPPAS, B. C. A.; VALENCIA-BARRERA, R. M.; FERNÁNDEZ-GONZÁLES, D. Distribuição de esporos de Cladosporium spp no ar atmosférico de Caxias do Sul, RS, Brasil, durante dois anos de estudo. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia,** São Paulo, v. 34, p. 55-58, 2011.