

MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

BEATRIZ THE IAMANAKA¹
IDJANE SANTANA OLIVEIRA²
MARTA HIROMI TANIWAKI¹

¹ Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, São Paulo.

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Vitória de Santo Antão, Pernambuco.

RESUMO

MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

As micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos e podem contaminar os alimentos destinados ao consumo humano e animal. As micotoxinas que serão discutidas nesta revisão são: aflatoxinas (AFLA), ocratoxina A (OTA), desoxynivalenol (DON), zearalenona (ZON), fumonisinas (FUMO), toxina T-2 e patulina (PAT). Serão apresentados os aspectos relevantes relacionados às micotoxinas como a natureza química, fatores que governam a produção de toxinas, a presença das micotoxinas mais comuns em alimentos, a metodologia para análise de micotoxinas e finalmente as formas de prevenção de micotoxinas.

Termos para indexação: metabólitos secundários de fungos, contaminação de alimentos, microbiologia de alimentos.

ABSTRACT

MYCOTOXINS IN FOODS

Mycotoxins are toxic metabolites produced by some filamentous fungal species and can contaminate foods destined for human and animal consumption. The mycotoxins that will be discussed in this revision are: aflatoxins (AFLA), ochratoxin A (OTA), desoxynivalenol (DON), zearalenone (ZON), fumonisins (FUMO), toxin T-2 and patulin (PAT). Relevant aspects related to mycotoxins such as chemical nature, factors which govern toxin production, the most common mycotoxin presence in foods, methodology for mycotoxin analysis and finally the way to prevent mycotoxins will be presented.

Index terms: fungal secondary metabolites, food contamination, food microbiology.

¹ E-mail: beatriz@ital.sp.gov.br.

1. DEFINIÇÃO

O termo micotoxina é derivado da palavra grega “mykes” que significa fungo e do latim “toxican” que significa toxinas. O termo é usado para designar um grupo de compostos produzidos por algumas espécies fúngicas durante seu crescimento e podem causar doenças ou morte quando ingeridas pelo homem ou animais. As micotoxinas são contaminantes naturais de difícil controle em alimento. Estima-se que cerca de 25% de todos os produtos agrícolas do mundo estejam contaminados por tais substâncias (Benett & Klich, 2003).

A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, portanto pode ocorrer em qualquer época do crescimento, colheita, ou estocagem do alimento. Contudo, o crescimento do fungo e a presença de toxinas não são sinônimos, porque nem todos os fungos produzem toxinas. Por outro lado as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo após a destruição dos fungos que as produziram. Os gêneros dos fungos mais comumente associados com toxinas que ocorrem, naturalmente, são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

2. NATUREZA QUÍMICA DAS MICOTOXINAS

As micotoxinas compreendem uma grande variedade de estruturas químicas de baixo peso molecular, agrupadas de acordo com o grau e tipo de toxicidade ao homem e animais. Algumas micotoxinas são relativamente simples, comparadas com toxinas bacterianas. A grande variação na natureza química das micotoxinas significa que são necessários numerosos métodos de extração das toxinas dos alimentos, dificultando também o seu controle. Além disso, vários procedimentos devem ser utilizados para identificação e quantificação. A Tabela 1 apresenta a natureza química de algumas micotoxinas (Purchase, 1974).

3. PRINCIPAIS MICOTOXINAS E FUNGOS PRODUTORES

Num extensivo trabalho publicado em 1993, pelo International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993), cinco toxinas fúngicas foram consideradas de maior risco à saúde humana e animal. Estas toxinas são: aflatoxinas (AFLA), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZON), desoxinivalenol (DON) e fumonisinas (FUMO). Existem toxinas com Toxina T-2, patulina e outras que podem causar

Tabela 1. — Natureza química de algumas micotoxinas.

Micotoxinas	Natureza química
Aflatoxinas	Compostos heterocíclicos altamente oxigenados (derivados de furanocumarinas)
Islanditoxina	Ciclopeptídeo contendo cloro
Luteosquirina	Derivado da antraquinona
Citreoviridina	Polieno fluorescente
Citrinina	Derivado do pirano
Patulina	Derivado da pirona
Ocratoxina	Amido formado por fenilalanina mais uma cloroisocumarina oxigenada
Zearalenona	Composto heterocíclico oxigenado
Tricotecenos	Sesquiterpenos
Fumonisinias	Diésteres de propanos

Fonte: Purchase (1974).

problemas esporadicamente, contudo, atualmente, estas cinco toxinas têm sido implicadas na maioria dos problemas e desafios das micotoxinas e micotoxicoses.

3.1. Aflatoxinas (AFLA)

Uma série de aflatoxinas são produzidas por fungos, destacando-se B_1 , B_2 , que apresentam fluorescência azul violeta e G_1 e G_2 , fluorescência azul esverdeada, quando analisadas em cromatografia de camada delgada à luz ultravioleta a 365nm. A aflatoxina B_1 é a mais tóxica das aflatoxinas, causando uma variedade de efeitos adversos e, em alguns casos podem ser letais, em diferentes espécies animais e humanos. Foi considerada pelo IARC (1993) como pertencente à classe 1, composto carcinógeno para humanos. O fígado é o principal órgão atingido após uma ingestão aguda por aflatoxinas, sendo as mesmas encontradas também em outros tecidos animais e produtos, como carne, milho e ovos. As aflatoxinas M_1 e M_2 são metabólitos hidroxilados das aflatoxinas B_1 e B_2 e podem estar presentes no leite e produtos derivados obtidos de animais que ingeriram ração contaminada com estas aflatoxinas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO) as principais fontes de aflatoxinas na ração animal são o milho, caroço de algodão e torta de amendoim (WHO, 2002).

Em aves as aflatoxinas causam danos ao fígado, prejuízo na produtividade e eficiência reprodutiva, decréscimo na produção de ovos, qualidade inferior da casca do ovo, qualidade da carcaça inferior e aumento na susceptibilidade às doenças. Os suínos são menos sensíveis do que as aves. A aflatoxina é hepatotóxica e os seus

efeitos crônicos em suínos são largamente atribuídos ao dano no fígado. Em gado, o sintoma primário é a redução no ganho de peso, bem como nos danos ao fígado e rim. Além disso, a produção do leite é reduzida. Existem evidências baseadas em estatísticas de que a aflatoxina é a causa da elevada incidência de câncer primário no fígado em Moçambique, Uganda, Tailândia, Quênia e Swazilândia.

É reconhecido que as espécies produtoras de aflatoxinas são *Aspergillus flavus*, produtores de aflatoxinas do grupo B e algumas vezes ácido ciclopiazônico (CPA), *A. parasiticus* e *A. nomius*, produtores de aflatoxinas do grupo B e G e não produtoras de CPA (Klich & Pitt, 1988; Pitt, 1993; Saito *et al.*, 1989; Kurtzman *et al.*, 1987). Além destas, várias espécies já foram relatadas como produtoras de aflatoxinas, porém a maioria destes relatos não foi confirmada posteriormente. Frisvad *et al.* (2006) revisaram os fungos produtores de aflatoxinas descritas na literatura e confirmaram as seguintes espécies, como mostra a Tabela 2.

3.2. Ocratoxina A (OTA)

A ocratoxina é uma potente micotoxina nefrotóxica que pode causar câncer em animais de laboratório e em suínos. Os danos e o efeito letal podem variar de acordo com o animal e o tipo de ingestão. Alguns animais são mais sensíveis à OTA, como os cães e porcos, por exemplo. A Tabela 3 apresenta os valores de DL₅₀ (dose letal para eliminar 50% da população em estudo) para diferentes animais.

A ocratoxina é suspeita como causa parcial do câncer do trato urinário e danos ao rim que ocorre no leste europeu. A ocratoxina A foi reclassificada pelo IARC (1993) como um possível carcinógeno para humanos (classe 2B).

Até recentemente a produção de ocratoxina A estava restrita à *Aspergillus ochraceus* e espécies relacionadas pertencentes à *Aspergillus* section *Circumdati* e à espécie *Penicillium verrucosum*. Recentemente, o número de trabalhos sobre a produção de ocratoxina A pelos membros de *Aspergillus* section *Nigri* tem aumentado, desde a sua primeira publicação em 1994 por Abarca *et al.* (1994). Estas espécies são muito comuns em alimentos de várias partes do mundo, mas principalmente em regiões com temperaturas mais quentes.

Após o clássico trabalho do gênero *Aspergillus* de Raper & Fennell (1965), vários autores revisaram o grupo *A. ochraceus*, utilizando técnicas moleculares e quimiotaxonômicas, a fim de estudar a variabilidade genética das espécies (Varga *et al.*, 2000b; Peterson, 2000; Frisvad *et al.*, 2004), contudo nem sempre os taxonomistas concordaram entre si. Na última revisão de Frisvad *et al.* (2004) as seguintes espécies

Tabela 2. — Fungos produtores de aflatoxinas confirmadas por Frisvad *et al.* (2006).

Espécie	Cabeça	Conídio	Esclerócios	Ocorrência	Micotoxinas
<i>Aspergillus flavus</i>	Maioria biseriada	Esféricos a elipsoidais, parede lisa a levemente rugosa	Grande, esférico	Trópicos e subtropicos	40% afa B 50% CPA
<i>A. parasiticus</i>	Raramente biseriada	Esféricos, parede rugosa	Grande, esférico (incomum)	América do Sul, EUA, Austrália	Quase 100% afa B e G
<i>A. nomius</i>	Maioria biseriada	Esféricos a elipsoidais, parede lisa a levemente rugosa	Pequeno, formato de bala	Brasil, EUA, Tailândia	Geralmente afa B e G
<i>A. bombycis</i>	Maioria biseriada	Esférico a sub esférico, rugoso	Sem relato	Japão, Indonésia	Afa B e G
<i>A. pseudolamarii</i>	Biseriada	Esférico a sub esférico, parede bem rugosa	Grande, esférico	Japão, Argentina	Afa B, CPA
<i>A. toxigenus</i>	Raramente biseriada	Esférico, parede rugosa	Grande, esférico	EUA, Uganda	Afa B e G
<i>A. parvisclerotigenus</i>	Maioria biseriada	Esférico, parede rugosa	Pequeno, esférico	EUA, Argentina, Japão, Nigéria	Afa B e G CPA
<i>A. ochraceoroseus</i>	Biseriada	Sub esférico a elipsoidal, parede lisa	Sem relato	Costa do Marfim	Afa B, esterigmatocistina
<i>A. rambelii</i>	Biseriada	Elipsoidal, parede lisa	Sem relato	Costa do Marfim	Afa B, Esterigmatocistina
<i>Emericella astellata</i>	Biseriada	Esférico, parede rugulosa	Ascomata e "hulle cells"	Ecuador	Afa B, Esterigmatocistina
<i>E. nenesuelensis</i>	Biseriada	Esférico, parede rugulosa	Ascomata e "hulle cells"	Venezuela	Afa B, Esterigmatocistina

Tabela 3. — Valores de DL₅₀ em mg/Kg peso corpóreo para ocratoxina A.

Espécie	DL ₅₀ (mg/Kg peso corpóreo) – Oral
Camundongo	46-58
Rato	20-30
Rato neonatal	3,9
Galinha	3,3
Cachorro	1,0
Cachorro	0,2

Fonte: Harwig *et al.* (1983).

de *Aspergillus* section *Circumdati* foram aceitas como produtoras de ocratoxina A: *Aspergillus cretensis*, *A. flocculosus*, *A. ochraceus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiorum*, *A. steynii*, *A. sulphureus*, *A. westerdijkiae* e *Neopetromyces muricatus*.

Os membros de *Aspergillus* section *Nigri* (grupo do *Aspergillus niger*) são largamente distribuídos na natureza e são fungos deterioradores comuns em alimentos. Alguns isolados deste grupo são utilizados na indústria, como fontes de enzimas extracelulares, ácidos orgânicos e no processamento de alimentos. Apesar da importância deste grupo, muitas tentativas têm sido feitas a fim de encontrar o critério taxonômico mais adequado. Os trabalhos clássicos de Raper & Fenell (1965) apresentaram o grupo *Aspergillus niger* composto de 12 espécies, de acordo com as suas características morfológicas. Outros autores revisaram este grupo, utilizando as técnicas moleculares ou quimiotaconômicas (Kusters–van Someren *et al.*, 1990; Abarca *et al.*, 2004, Varga *et al.*, 2000a; Samson *et al.*, 2004). Até o momento, ainda não existe uma concordância entre os diferentes grupos.

Dentre as 15 espécies de *Aspergillus* section *Nigri* estudadas por Samson *et al.* (2004), somente quatro espécies foram confirmadas como produtoras de ocratoxina A: *A. carbonarius*, *A. niger sensu stricto*, *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger*. As demais espécies testadas: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. japonicus*, *A. piperis*, *A. tubingensis* e *A. vadensis*, algumas das quais descritas na literatura como produtoras dessa toxina, não foram confirmadas como produtoras. *Aspergillus carbonarius* descrito por Horie (1995) é o maior produtor de ocratoxina A do grupo do *Aspergillus* section *Nigri*.

Dentre as espécies de *Penicillium*, *P. verrucosum* é a maior fonte de ocratoxina A, sendo esta espécie mais comum em países de climas temperados e frios, enquanto que *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e outras espécies do grupo A *niger* são mais comuns em climas tropicais e quentes. Outra espécie de *Penicillium* produtora de ocratoxina A é *P. nordicum*.

3.3. Desoxinivalenol (DON)

O desoxinivalenol é um tricoteceno do tipo B, um epoxi-sesquiterpenoide. Segundo o IARC (1993) o DON não é de risco à indução de câncer, embora a co-ocorrência com aflatoxina pode aumentar a carcinogenicidade da aflatoxina.

O desoxinivalenol provavelmente é a micotoxina mais largamente distribuída em alimentos e rações (Miller, 1995). O animal doméstico mais afetado é o suíno. A toxicose aguda é manifestada como uma desordem intestinal. O DON raramente causa uma toxicidade aguda porque a sua presença na ração faz o animal rejeitar a ração. Este efeito resulta no decréscimo do crescimento do animal, além dos efeitos reprodutivos incluindo o aborto e o nascimento enfraquecido. As aves são mais tolerantes do que os suínos quanto à presença de DON na dieta, embora a qualidade do ovo e o peso possam ser reduzidos. O gado também é mais tolerante do que os suínos, possivelmente devido à degradação da toxina em metabólitos secundários no rúmem. Os efeitos no gado incluem redução no consumo da ração e taxa de concepção. Os grãos naturalmente contaminados com o DON podem afetar a produção de leite.

Em 1988 o DON foi responsável por uma larga escala de incidente de toxicose humana no Vale Kashmir, na Índia. A toxicose foi reportada também na China, Japão e Korea entre outros países (Beardall & Miller, 1994; Kuiper–Goodman, 1994).

Desoxinivalenol é comum em grãos como trigo, cevada, aveia, centeio, milho e sorgo e sua ocorrência está associada primariamente com *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) e *F. culmorum*, ambos são fungos fitopatógenos que causam fusariose da espiga do trigo no trigo e podridão de orelha de *Gibberella* no milho. Uma relação direta entre a incidência de fusariose e a contaminação do trigo com desoxinivalenol tem sido estabelecido. A incidência de fusariose da espiga do trigo está fortemente associada com a umidade na época do florescimento, e com a época das chuvas. *Fusarium graminearum* cresce otimamente à temperatura de 25 °C e atividade de água acima de 0,88. Enquanto que *F. culmorum* cresce bem a 21 °C e atividade de água acima de 0,87. A distribuição geográfica das duas espécies parece ser relacionada à temperatura, sendo o *F. graminearum* a espécie mais comum em climas mais quentes.

3.4. Zearalenona

A zearalenona ocorre principalmente, no milho contaminado por *F. graminearum* e *F. culmorum*. Esta toxina é um análogo do estrógeno e causa o hiperestrogenismo

em suínos femininos. A zearalenona tem sido implicada em vários incidentes nas mudanças da puberdade em crianças (Kuiper–Goodman *et al.*, 1987). Os sintomas nos suínos incluem inchaço e avermelhamento da vulva, super desenvolvimento do útero e glândulas mamárias, prolapsos da vagina e reto. Em gado os efeitos reprodutivos são menos pronunciados do que em porcos, mas afetam a fertilidade, causa um desenvolvimento atípico secundário nas características sexuais de novilhos e decréscimo na produção do leite (Prelusky *et al.*, 1994).

O IARC (1993) avaliou a carcinogenicidade da zearalenona e encontrou ser um possível carcinógeno humano. Os resíduos de zearalenona não parecem ser um problema se for consumido (Prelusky, 1994).

3.5. Fumonisinias

As fumonisinias são produzidas por *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e várias outras espécies de *Fusarium* menos comuns. As fumonisinias foram descobertas em 1988. Existem pelo menos três fumonisinias ocorrendo naturalmente FB₁, FB₂ e FB₃. A FB₁ ocorre em concentração maior seguida pela FB₂ e FB₃. As fumonisinias têm sido encontradas como um contaminante comum de alimentos e rações à base de milho nos EUA, China, Europa, África do Sul e América do Sul (Miller, 1995). A alimentação de milho contaminado com *F. verticillioides* tem sido associada às elevadas taxas de câncer esofágico em Transkei por mais de 15 anos e este fato tem sido diretamente ligado à exposição à fumonisina (Thiel *et al.*, 1992). As fumonisinias têm exibido uma atividade promotora de câncer em ratos, mas não são mutagênicas. Ainda não há informação suficiente para determinar se as fumonisinias são carcinogênicas ao homem, contudo existe uma possível associação do câncer esofágico humano, causado pela ingestão de grãos contaminados por *F. verticillioides* contendo fumonisinias e fusarina C. As fumonisinias são estáveis na maioria dos alimentos processados.

A doença dos equinos leucoencefalomalácea (LEME) tem sido reconhecida estar associada com o milho contaminado por *F. verticillioides*. A LEME causa uma necrose líquifácea massiva dos hemisférios cerebrais, assim a doença envolve manifestações neurológicas incluindo movimentos anormais. A morte pode ocorrer sob exposição à alta concentração da toxina horas após o princípio de sintomas visíveis (Prelusky *et al.*, 1994).

3.6. Toxina-T2

No passado, a toxina T-2 de *Fusarium* esteve implicada na doença aleucia tóxica alimentar (ATA). Durante a segunda guerra mundial, os russos foram forçados a consumir os grãos invernados no campo. Milhares de pessoas foram afetadas pela ATA, resultando na eliminação de vilas inteiras (Mirocha, 1984). Esta síndrome foi associada às toxicoses causadas por T-2/neosolaniol/tetrol T-2, produzidas por *F. sporotrichioides*, em milho úmido deixados no campo. Apesar da vasta literatura sobre a toxina T-2, os dados de ocorrência mostram que ela não é comum, simplesmente porque os grãos têm sido colhidos apropriadamente.

3.7. Patulina

A patulina é uma lactona, solúvel em água e foi isolada na década de 40 a partir de *P. patulum* Bainier (*P. griseofulvum*), sendo produzida por mais de 60 espécies de fungos distribuídos em 30 gêneros (Moake *et al.*, 2005). Durante a década de 50 foi comprovado que a patulina, além de apresentar atividade antimicrobiana, antiviral e antiprotozoária, também era tóxica a plantas e animais, sendo classificada em 1960 como micotoxina. Atualmente, *P. expansum* Link, que causa podridão em maçã, pêra, cereja e outras frutas, é o principal produtor de patulina, sendo responsável por cerca de 70 a 80% da deterioração de frutas armazenadas, em especial maçã (Leggott & Shephard, 2001).

Patulina é comum em sucos de frutas (especialmente maçã e pêsego), trigo, pó de cacau, queijo, salame, feijão, soja, milho, cevada, presunto, amendoim, plantas forrageiras e para silagem e pode ser produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Byssosclamyces* (Puel *et al.*, 2010). A produção de patulina pelo fungo ocorre nas partes danificadas do fruto, sendo que a intensidade de difusão dessa micotoxina é de 2 cm em direção ao tecido sadio em maçã (Rychlik & Schieberle, 2001).

A Organização Mundial de Saúde recomenda um nível máximo aceitável de 50 µg/L de patulina em suco de maçã (FAO, 1997). A União Européia adotou este mesmo limite e também 25 µg/L em produtos sólidos incluindo compota e purê de maçã. Além disso, o limite máximo de 10 é proposto para produtos de maçã destinados às crianças (The Commission of the European Communities, 2006). Embora, as avaliações revelem que a exposição da população européia está bem abaixo de 0,4µg/kg por peso corporal, grupos específicos de consumidores,

especialmente os recém-nascidos, estão mais expostos, pois eles tendem a consumir mais produtos derivados de maçã (Welke *et al.*, 2009).

Em ratos a patulina apresentou propriedades mutagênicas, teratogênica e carcinogênica, afetando os órgãos com maior suprimento sanguíneo, a exemplo do cérebro, fígado e rins (Benett & Klich, 2003). Mas, segundo Puel *et al.* (2010), o IARC classifica a patulina no grupo 3 como “ não classificada como carcinogênica para humanos”. Isto ocorre devido a inexistência de pesquisas com a patulina cujo acompanhamento seja prolongado e ampliado para vários animais e tecidos. Ao nível celular, a patulina tem mostrado efeitos que incluem rompimento da membrana de células plasmáticas e inibição da síntese de DNA, mas apresentou resultados negativos no testes de genotoxicidade de Ames (Puel *et al.*, 2010). Segundo Arafat & Musa (1995), patulina inibe o crescimento e a síntese de proteína em cultura de tecido hepático e isso se deve ao bloqueio da captação dos aminoácidos por meio da membrana e também à sua incorporação na proteína.

O risco à saúde pública devido à exposição a patulina produzida por espécies de *Penicillium*, especialmente *P. expansum* (suco de maçã) e *P. sclerotigenum* (inhamo) é ainda maior, uma vez que Oliveira *et al.* (2006) verificaram que *P. sclerotigenum* foi capaz de infectar e se estabelecer em maçã, banana, pêra e beterraba, além do inhamo. Essas possibilidades de infecção sugerem a necessidade de realização de pesquisas para detecção e determinação da concentração de patulina em tais alimentos.

4. CONDIÇÕES QUE GOVERNAM A PRODUÇÃO DE TOXINAS

O conhecimento das condições que governam a produção de toxinas pode contribuir na prevenção das mesmas no alimento. Os fatores principais serão discutidos. Dentre os fatores envolvidos na produção de micotoxinas existem os relacionados a própria fisiologia e bioquímica dos fungos toxigênicos e os fatores extrínsecos (ambientais), tais como: umidade, composição química do alimento (substrato), temperatura, pH, interação microbiana, entre outros.

4.1. Fungo

Nem todos os fungos produzem toxinas, além disso, nem todas as espécies de fungos toxigênicos produzem toxinas. De acordo com Pitt (2006) 50% dos isolados de *A. flavus* produzem aflatoxinas. Portanto a presença de fungos no alimento não implica que toxinas foram produzidas, por outro lado, a ausência de sinais visíveis

de emboloramento não significa que o alimento está livre de toxinas, uma vez que as mesmas podem persistir após os fungos terem desaparecido. Algumas micotoxinas são relativamente termorresistentes e podem apresentar-se ativas, mesmo após o processamento térmico, sendo mais sensíveis ao tratamento químico, a exemplo da patulina que não é destruída após pasteurização do suco de maçã por 10 segundos e perde sua atividade biológica em meio alcalino, na presença de cisteína ou ainda na presença de conservantes de alimentos contendo dióxido de enxofre (CODEX, 1998).

4.2. Substrato

As micotoxinas podem ser encontradas em vários alimentos, contudo certos alimentos são mais susceptíveis que outros. Em geral alimentos com alto teor de carboidratos são mais favoráveis à produção de toxinas. Contudo as espécies de *Aspergillus* section *Flavi* têm mostrado uma preferência às oleaginosas como amendoim, castanhas do brasil, pistácias e amêndoas.

4.3. Umidade relativa do ar e do substrato

A maioria dos fungos necessita de umidade relativa acima de 80% e um mínimo de atividade de água (Aa) para crescer. A produção de toxina pode não ocorrer em umidade relativa abaixo daquele valor. As toxinas podem ser produzidas em atividades de água que vão de 0,60 a 0,90 em alimentos de umidade intermediária. O conteúdo de água é dependente da umidade relativa do ar à uma determinada temperatura. Os fungos são mais resistentes aos efeitos das condições de baixa Aa do que as bactérias e leveduras, e alguns podem sobreviver em produtos com uma Aa tão baixa quanto 0,60, embora 0,70 seja o mínimo que sustém o crescimento de fungos de armazenamento. A Tabela 4 apresenta as condições de Aa para crescimento e produção de toxinas por algumas espécies fúngicas.

4.4. Temperatura

O crescimento fúngico é sensível à temperatura. A temperatura mínima para o fungo crescer não é necessariamente a mínima para ele produzir toxina, o mesmo com a máxima. Em geral, a temperatura ótima para produzir toxinas está entre a temperatura mínima e a máxima para ele crescer.

Tabela 4. — Valores de Atividade de água (Aa) mínimo e ótimo para crescimento e produção de toxinas de algumas espécies fúngicas.

Espécies fúngicas	Aa Mínimo	Aa Ótimo
<i>Aspergillus flavus</i> (crescimento)	0,80	0,98
<i>Aspergillus flavus</i> (produção de aflatoxinas)	0,82	0,95 a 0,99
<i>Aspergillus parasiticus</i> (crescimento)	0,80 a 0,83	0,99
<i>Aspergillus parasiticus</i> (produção de aflatoxinas)	0,86 a 0,87	0,95
<i>Aspergillus ochraceus</i> (crescimento)	0,79	0,95 a 0,99
<i>Aspergillus ochraceus</i> (produção de ocratoxina A)	0,83	0,98 a 0,99
<i>Aspergillus carbonarius</i> (crescimento)	0,85	0,96-0,98
<i>Aspergillus carbonarius</i> (produção de ocratoxina A)	0,92	-
<i>Fusarium graminearum</i> (crescimento)	0,90	-
<i>Fusarium graminearum</i> (produção de desoxinivalenol)	0,95	-
<i>Fusarium verticillioides</i> (crescimento)	0,87	-
<i>Fusarium verticillioides</i> (produção de fumonisina B ₁)	0,92	-
<i>Penicillium crustosum</i> (produção de penitrem A)	0,92	0,995
<i>Penicillium verrucosum</i> (crescimento)	0,80	-
<i>Penicillium verrucosum</i> (produção de ocratoxina A)	0,86 a 0,87	-
<i>Penicillium expansum</i> (crescimento)	0,82-0,83	-
<i>Penicillium expansum</i> (produção de patulina)	0,95	-

Fonte: Pitt & Hocking (2009).

Os mais altos índices de contaminação por micotoxinas são encontrados em alimentos provenientes de regiões tropicais e semi tropicais, onde o clima favorece o desenvolvimento de fungos toxigênicos. A Tabela 5 apresenta as condições de temperatura para o crescimento e produção de toxinas por algumas espécies toxigênicas.

4.5. Atmosfera

A maioria dos fungos são aeróbios, contudo alguns fungos que causam deterioração de grãos armazenados podem crescer em atmosfera contendo somente 0,1 a 0,2% de oxigênio, ou em atmosfera contendo mais que 80% de dióxido de carbono. *Byssoschlamys nivea* produtora de patulina, que comumente causa deterioração de sucos e polpas de frutas pasteurizadas, foi capaz de crescer em ambiente com

60% CO₂ e teores menores que 0,5% O₂, formando colônias de 40mm de diâmetro após 30 dias (Taniwaki *et al.*, 2009). *Fusarium oxysporium*, produtor de moniliformina, foi capaz de crescer em atmosfera com 99% de CO₂ (Pitt & Hocking, 2009).

4.6. Interação microbiana

Em condições naturais há uma interação de fungos, leveduras e bactérias. A toxina produzida pode afetar outros microrganismos, tornando um problema à microbiota, por outro lado, certos microrganismos podem reduzir, remover ou degradar a toxina. Existem evidências de que as toxinas são produzidas em menor quantidade quando os fungos toxigênicos crescem em presença de outros microrganismos. Algumas espécies de *Trichoderma* spp. são conhecidas por produzir diversos metabólitos com atividade antifúngica e são utilizadas no controle biológico e prevenção de patógenos de plantas.

5. PRESENÇA DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

As micotoxinas já foram encontradas em quase todos os tipos de cereais, oleaginosas e produtos alimentícios, tanto de origem vegetal como animal.

Atualmente, existem informações suficientes para decidir quais os alimentos e matérias primas que são de maior risco, pois alguns produtos são muito mais susceptíveis que outros à invasão de fungos potencialmente toxigênicos. A Tabela 6 e 7 ilustram as matérias primas e os alimentos de significativo risco de infecção fúngica e formação de micotoxinas (Pitt, 1984). A maioria destes alimentos pode ser monitorada quanto à presença de fungos, mas existem algumas exceções como os alimentos termo-processados que devem ser testados no estágio de matéria prima ou por análises químicas.

A contaminação em produtos animais pode ocorrer como resíduo tecidual de micotoxinas ingeridas pelo animal nas rações contaminadas. Assim, quando os animais leiteiros são alimentados com ração contendo aflatoxina, o metabólito M₁ aparece no leite.

Queijos e embutidos cárneos podem ser monitorados imediatamente após a manufatura, mas a deterioração destes produtos, normalmente, ocorre durante e após o varejo, estando assim fora do controle do fabricante. A deterioração dos produtos perecíveis refrigerados é geralmente visível. Os ovos e o leite, incluindo os produtos de laticínios, particularmente os queijos, podem conter toxinas presentes como

Tabela 6. — Alimentos com um alto risco de contaminação por micotoxinas.

Alimento	Fungo provável	Micotoxinas prováveis
Amendoim, amêndoas	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Aflatoxinas, CPA
Milho	<i>A. flavus</i> <i>Fusarium</i> spp <i>F. verticillioides</i>	Aflatoxinas Tricotecenos, zearalenona Fumonisinias
Sorgo	<i>Fusarium</i> spp <i>Alternaria</i> spp <i>A. flavus</i>	Tricotecenos Alternariol, metil eter alternariol, ácido tenuazônico Aflatoxinas

resíduos que podem ser apenas monitorados pelos métodos químicos. Portanto, matérias primas de alto risco devem sempre ser monitorados micologicamente e quanto à presença de toxinas.

O clima tropical favorece a proliferação dos fungos produtores de aflatoxinas. Os trabalhos pioneiros mostraram a presença de aflatoxinas em vários alimentos e rações (Menezes *et al.*, 1965/66; Tango *et al.*, 1965/66; Fonseca, 1968; Fonseca, 1969; Purchio, 1969; Sabino *et al.*, 1976). Atualmente existem vários esforços por parte da indústria, cooperativas e produtores de amendoim a fim de minimizar a presença de

Tabela 7. — Alimentos e matérias primas com um moderado risco de contaminação por micotoxinas.

Alimento	Fungo provável	Micotoxinas prováveis
Trigo	<i>Penicillium</i> spp. <i>Alternaria</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>F. graminearum</i>	Ocratoxina, CPA, tremorgênicos, citrinina Alternariol, metil eter alternariol, ácido tenuazônico Tricotecenos (DON, nivalenol) DON
Cevada	<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina
Farinha	<i>Penicillium</i>	Várias
Cereais matinais à base de milho	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Fusarium</i> spp.	Aflatoxinas Tricotecenos, fumonisinias
Cereais matinais à base de trigo	<i>Fusarium</i> spp.	Tricotecenos
Queijo	<i>Penicillium</i> spp.	Várias
Carnes processadas, salami	<i>Penicillium</i> spp.	Várias
Leite e queijo	Resíduos	Aflatoxina M
Ovos	Resíduos	Aflatoxinas, ocratoxina, tricotecenos
Maçãs	<i>Penicillium expansum</i>	Patulina

aflatoxinas nestes produtos.

Caldas *et al.* (2002) após análise de 366 amostras de alimentos consumidos no Distrito Federal, incluindo amendoim e derivados, castanhas, milho, produtos de trigo e/ou aveia, arroz e feijão entre 1998 a 2001, detectaram a presença de aflatoxinas em 19,2% das amostras, dentre elas, amendoim e derivados, milho e castanha do Pará. Amendoim e derivados apresentaram maior incidência de contaminação por aflatoxinas (34,7%) com amostras contendo até 1.706 µg/kg de aflatoxinas totais.

O milho e produtos derivados são alimentos com alto potencial de contaminação por micotoxinas. Espécies produtoras de aflatoxinas, fumosininas, tricotecenos e zearalenona estão presentes na micobiota do grão, ora causando uma infecção ainda no campo, ora após a colheita, durante o transporte dos grãos, secagem e estocagem. Kawashima & Soares (2006), avaliaram a ocorrência de fumonisinas, aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em 74 produtos derivados de milho provenientes do estado de Pernambuco. Fumonisina B₁ foi encontrada em 94,6% (variando de 20 a 8600 µg/kg) e apenas 5 amostras continham aflatoxina B₁ e duas ultrapassaram o limite de 20 µg/kg para aflatoxinas totais. As aflatoxinas G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona não foram detectadas em nenhuma das amostras. Todas as amostras contaminadas com aflatoxinas também apresentaram fumonisina B₁.

Aspergillus section *Nigri* são a fonte de OTA em produtos como uvas (Da Rocha Rosa *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2003), frutas secas (Iamanaka *et al.*, 2005; Heenan *et al.*, 1998; Abarca *et al.*, 2003) e uma fonte menor em café (Joosten *et al.*, 2001; Taniwaki *et al.*, 2003; Urbano *et al.*, 2001). Battilani *et al.* (2003) avaliando uvas das regiões do norte e sul da Itália, identificaram 477 isolados de *Aspergillus* sp. Deste total 97% (464 isolados) foram pertencentes à *Aspergillus* section *Nigri*. Dentro deste grupo, 86 foram identificados como *Aspergillus carbonarius* que apresentaram 60% do total de isolados produtores de OTA, e o restante, 378 isolados foram considerados apenas como grupo do *Aspergillus niger*. Apenas 4% foram produtores de OTA.

6. ANÁLISE DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

As micotoxinas encontram-se nos alimentos em baixas concentrações e assim requerem métodos analíticos sensíveis e confiáveis para sua detecção. Devido à variedade de estruturas químicas destes compostos, não é possível usar um método padrão para detectar todas as micotoxinas. Os métodos de extração e limpeza devem ser confiáveis e são vitais para o sucesso da análise. Eles demandam a maior parcela do tempo total da análise e são dependentes da matriz e da estrutura da toxina.

Os principais métodos de extração utilizados para análise de micotoxinas são: extração líquido-líquido, extração por fluido supercrítico e extração em fase sólida. A extração líquido-líquido é baseada na diferença de solubilidade das toxinas em fase aquosa e em solventes orgânicos. Na extração com fluido supercrítico é utilizado um fluido, como o CO₂ por exemplo, para extrair o composto da matriz. Esta técnica não é tão adequada para análises de rotina devido ao seu elevado custo. Na extração em fase sólida a toxina fica retida em cartuchos preenchidos com diversos tipos de materiais, sílica gel, fase reversa, troca iônica, carvão ativado e anticorpos específicos para cada micotoxina, como é o caso das colunas de imunoafinidade, técnica mais largamente utilizada atualmente.

Os principais métodos de separação para análise de micotoxinas são cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa. A cromatografia de camada delgada é uma técnica simples e barata, na qual é possível analisar qualitativamente vários compostos concomitantemente, e pode ser utilizada também como método semi-quantitativo. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma técnica recente e é considerada atualmente, referência na análise de micotoxinas. Nesta técnica, não há necessidade da limpeza da amostra e várias micotoxinas podem ser analisadas simultaneamente. Vários trabalhos utilizando esta técnica foram publicados para análise de toxinas de *Fusarium*, como a zearalenona (Zöllner & Mayer-Helm 2006; Songsermsakul *et al.*, 2006; Rosenberg *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 2008) e fumonisinas (Senyuva *et al.*, 2008; Faberi *et al.*, 2005). Já para aflatoxinas os trabalhos não são comuns, já que os métodos utilizando HPLC com detector de fluorescência encontram-se bem estabelecidos. Na cromatografia líquida de alta eficiência, colunas de fase normal ou fase reversa são usadas para separação e purificação da toxina, dependendo da sua polaridade. Os principais métodos de detecção utilizados são UV e fluorescência. Para algumas micotoxinas, como por exemplo, as fumonisinas, a derivatização é necessária com um reagente específico devido à ausência de um cromóforo. A utilização da fluorescência natural de algumas micotoxinas, como as aflatoxinas, ocratoxina A, citrinina e outras, possibilita uma alta especificidade e sensibilidade e vários métodos já foram estabelecidos pela AOAC entre outros (Cigić & Prosen 2009). A cromatografia gasosa é utilizada somente para analitos voláteis e termicamente estáveis. Já foram publicados vários utilizando a técnica de CG para análise de tricotecenos e outras micotoxinas de *Fusarium* (Langseth & Rundberget, 1998; Onji *et al.*, 1998; Krska *et al.*, 2007). Acoplado à

técnica de espectrometria de massas, há a possibilidade de confirmação da identidade dos compostos.

Por outro lado, métodos moleculares possibilitam a triagem de fungos toxigênicos em alguns alimentos, sendo tal detecção feita com amostras de culturas do fungo isoladas do alimento ou mesmo com o próprio alimento. Paterson *et al.* (2000) descreveram uma sequência de *primer* para o gene *idb* da enzima isoeopoxidona desidrogenase (IDH) da via metabólica de síntese da patulina em *Penicillium expansum*. A partir do estudo deste gene foi possível detectar por PCR a presença de outras espécies de *Penicillium* toxicogênicos em alimentos, tais como, maçã e pêssego, concluindo que a detecção do gene *idb* é um recurso para triagem de fungos toxicogênicos.

A partir das informações obtidas com a triagem de *P. expansum* toxigênico em maçãs destinadas à fabricação de suco de maçã foi possível estabelecer a PCR para detecção do mesmo gene *idb* na espécie *P. sclerotigenum*, pertencente a mesma seção taxonômica de *P. expansum*. Tal metodologia já está disponível para a detecção molecular de *P. sclerotigenum* toxigênico em amostras de inhame destinadas ao consumo humano. Ademais, a confirmação da detecção molecular do gene da via metabólica de síntese da patulina em inhame ocorreu pela detecção, por cromatografia líquida de alta eficiência, da própria toxina em inhame, atingindo valor médio de 427mg/kg de inhame, indicando altíssima contaminação deste alimento (Araujo *et al.*, 2010, no prelo).

7. PERDAS ECONÔMICAS DEVIDO À CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS COM MICOTOXINAS

A magnitude das perdas econômicas devido às micotoxinas embora não seja totalmente visível, implica um custo em vários níveis, como por exemplo:

- (i) Perdas diretas de produtos agrícolas
- (ii) Perdas de animais acompanhadas de diversas taxas de morte
- (iii) Doenças humanas e diminuição da produtividade
- (iv) Diminuição da velocidade de crescimento em animais
- (v) Custos indiretos dos sistemas de controle existentes para algumas micotoxinas
- (vi) Custos de destoxicação para poder recuperar um produto aceitável
- (vii) Rejeição de produtos pelo mercado importador

A rejeição de mercadoria por importadores, ou mesmo a queda nos preços de

venda, são prejudiciais à economia de países que, como o Brasil, exportam grande quantidade de produtos altamente susceptíveis à contaminação por micotoxinas. Os países que esperam competir no mercado internacional e desejam proteger seus consumidores e os suprimentos domésticos de alimentos, devem atacar o problema das micotoxinas, como atacam os problemas causados por outros poluentes ambientais.

8. PREVENÇÃO DAS MICOTOXINAS

Medidas preventivas devem ser tomadas em todo o estágio de plantio, colheita, transporte, estocagem e processamento do produto final. Algumas medidas práticas que podem contribuir para se não eliminar totalmente, pelo menos manter em níveis bem baixos e aceitáveis a presença de micotoxinas em alimentos destinado ao consumo humano e dos animais, são:

1. Adoção de práticas agrícolas corretas:

- (i) Equipamentos de colheita ajustados para operar adequadamente, produzindo o menor dano mecânico.

- (ii) Coletar imediatamente o produto ao atingir a maturidade.

- (iii) Secar o produto até níveis seguros de umidade, tão logo quanto seja possível, de maneira a atingir no produto uma Aa segura.

- (iv) Sementes oleaginosas e grãos deverão ser limpos para remover matéria orgânica e sementes danificadas, e as áreas de armazenamento deverão ser limpas e livres de insetos e roedores, protegidas das influências climáticas.

2. Destoxicação quando possível de alimentos e rações contaminadas.

3. Controle dos alimentos e rações em relação à contaminação pelas micotoxinas de maior destaque.

9. CONCLUSÃO

Cinco décadas se passaram desde que as aflatoxinas foram descobertas e ainda não foi encontrado um método satisfatório de prevenção da contaminação de micotoxinas em produtos agrícolas. Por outro lado, existe um grande esforço de instituições e organizações à nível nacional e internacional, como as Comissões do Codex Alimentarius, o Comitê da FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares e Contaminantes (JECFA) a fim de integrar as ações e estratégias que minimizem a ocorrência de micotoxinas e os efeitos danosos à saúde do consumidor.

Em 22 de fevereiro de 2010 foi publicado no Diário Oficial da União, nº 37, página 72-73, a Resolução RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2010, que dispõe sobre limites máximos de micotoxinas em alimentos, incluindo limites para aflatoxinas, ocratoxina A, desoxinivalenol, fumonisinas, patulina e zearalenona, em alimentos prontos para a oferta ao consumidor e em matérias-primas.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M.L., ACCENSI, F., BRAGULAT, M.R., CASTELLA, G. & CABANES, F.J. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection* 66:504–506. 2003.

ABARCA, M.L., ACCENSI, F., CANO, J. & CABANES, F.J. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:33–49. 2004.

ABARCA, M.L., BRAGULAT, M.R., CASTELLÁ, G. & CABANES, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2650–2652. 1994.

ARAFAT, W. & MUSA, M.N. Patulin–induced inhibition of protein synthesis in hepatoma tissue culture. *Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology* 87:177–186. 1995.

ARAÚJO, M.C., OLIVEIRA, I.S., MOURA, R.M. & ALVES, C.S. Detecção molecular por PCR e HPLC da micotoxina patulina em inhame infectado por *Penicillium sclerotigenum*. *Mycological Research*. 2010. (no prelo)

BATTILANI, P., PIETRI, A., BERTUZZI, T., LANGUASCO, L., GIORNI, P. & KOZAKIEWICZ, Z. Occurrence of ochratoxin A–producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection* 66:633–636. 2003.

BEARDALL, J.M. & MILLER, J.D. Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. In: Miller, J.D. & Trenholm, H.L. (eds.) *Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin*. St. Paul, Minnesota, US. Eagan Press. 1994. pp.487–539.

BENNET, J.W. & KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical of Microbiology Review* 16: 497–516. 2003.

CALDAS, E.D.C., SILVA, S.C. & OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Revista da Saúde Pública* 36:319–323. 2002.

CIGIĆ, I.K. & PROSEN, H. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Science* 10: 62–115. 2009.

CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS. Position paper on patulin. WHO/FAO. 1988.

DA ROCHA ROSA, C.A., PALACIOS, V., COMBINAS, M., FRAGA, M.E., OLIVEIRA, R., MAGNOLI, C.E. & DALCERO, A.M. Potential ochratoxin A from wines grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants* 19:408–414. 2002.

FABERI, A., FOGLIA, P., PASTORINI, E., SAMPERI, R. & LAGANÀ, A. Determination of type B fumonisin mycotoxins in maize and maize-based products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a QqQ (linear ion trap) mass spectrometer. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 19:275–282. 2005.

FRISVAD, J.C., THRANE, U., SAMSON, R.A. & PITT, J.I. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A. & Thrane, U. (eds). *Advances in Food Mycology*. New York. Springer. 2006. pp.3–31.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Worldwide regulations for mycotoxins. 1995. FAO. 1997. pp.7–28.

FONSECA, H. Contribuição ao estudo da ocorrência de aflatoxina em tortas, farelos e farinha de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) no Estado de São Paulo (Tese de doutorado). Piracicaba. Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”. USP. 1968.

FONSECA, H. Contribuição ao estudo da aflatoxina no amendoim (*Arachis hypogaea* L.) da colheita à industrialização. Tese de Livre Docência. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. USP. 1969.

FRISVAD, J.C., FRANK, J.M., HOUBRAKEN, J.A.M.P., KUIJPERS, A.F.A. & SAMSON, R.A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50:23–43. 2004.

HARTMANN, N., ERBS, M., WETTSTEIN, F.E., HOERGER, C.C., SCHWARZENBACH, R.P. & BUCHELI, T.D. Quantification of zearalenone in various solid agroenvironmental samples using D-6-Zearalenone as the internal standard. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:2926–2932. 2008.

HARWIG, J., KUIPER-GOODMAN, T. & SCOTT, P.M. Microbial food toxicants: Ochratoxins. In: Rechcig I.M. (ed.). *Handbook of Foodborne Diseases of Biological Origin*. Boca Raton. CRC Press. 1983. pp.193–238.

HEENAN, C.N., SHAW, K.J. & PITT, J.I. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology* 1:67–72. 1998.

HORIE, Y. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakuka i Kaiko* 36:73–76. 1995.

IAMANAKA, B.T., TANIWAKI, M.H., MENEZES, H.C., VICENTE, E. & FUNGARO, M.H.P. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants* 22:1258–1263. 2005.

INTERNATIONAL AGENCY ON RESEARCH IN CANCER (IARC). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins In: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Monograph 56. Lyon. 1993.

JOOSTEN, H.M.L.J., GOETZ, J., PITTET, A., SCHELLENBERG, M. & BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *International Journal of Food Microbiology* 65:39–44. 2001.

KAWASHIMA, L.M. & SOARES, L.M.V. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. *Ciência Tecnologia de Alimentos* 26:516–521. 2006.

KLICH, M.A. & PITT, J.I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society* 91:99–108. 1988.

KRSKA, R., WELZIG, E. & BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology* 137:241–264. 2007.

KUIPER–GOODMAN, T. Prevention of human mycotoxicosis through risk assessment and risk management. In: Miller J.D. & Trenholm H.L. (eds) *Mycotoxins in grains*. St Paul. Minnesota. USA. Eagan Press. 1994. pp.439–470.

KUIPER–GOODMAN, T., SCOTT, P.M. & WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 7:253–306. 1987.

KURTZMAN, C.P., HORN, B.W. & HESSELTINE, C.W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53:147–158. 1987.

KUSTERS–VAN SOMEREN, M.A., KESTER, H.C.M., SAMSON, R.A. & VISSER, J. Variation in pectinolytic enzymes in black *Aspergilli*: A biochemical and genetic approach. In: Samson, R.A. & Pitt, J.I. (eds), *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. New York. Plenum Press. 1990. pp. 321–334.

LAI, C.L., FUH, Y.M. & SHIH, Y.C. Detection of mycotoxin patulin in apple juice. *Journal of Food and Drug Analysis* 8:85–96. 2000.

LANGSETH, W. & RUNDBERGET, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of Chromatography A* 815:103–121. 1998.

LEGGOTT, N.L. & SHEPHARD, G.S. Patulin in South African commercial apple products. *Food Control* 12:73–76. 2001.

MENEZES, T.J.B., TANGO, J.S., COELHO, F.A.S. & TEIXEIRA, C.G. Ocorrência de *Aspergillus flavus* e da aflatoxina em sementes, tortas e farelos de amendoim. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos* 1:559–566. 1965/66.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *Journal of Stored Products Research* 31:1–16. 1995.

MIROCHA, C. J. Mycotoxicoses associated with *Fusarium*. In: Moss, M.O. & Smith, J.E. (eds) *The applied mycology of Fusarium*. Cambridge. University Press. 1984. pp.141–155.

MOAKE, M.M., PADILLA–ZAKOUR, O. & WOROBO, R.W. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 4:8–21. 2005.

ONJI, Y., AOKI, Y., TANI, N., UMEBAYASHI, K., KITADA, Y. & DOHI, Y. Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 815:59–65. 1998.

OLIVEIRA, I.S., MOURA, R.M., LUZ, E.D.M.N., MAIA, L. Patogenicidade de *Penicillium sclerotigenum* a diferentes frutas e hortaliças em pós-colheira. *Fitopatologia Brasileira* 31:408–410. 2006.

PATERSON, R.R.M. Primers from the isoeopoxydon dehydrogenase gene of the patulin biosynthetic pathway to indicate critical control points for patulin contamination of apples. *Food Control* 17:741–744. 2000.

PETERSON, S.W. Phylogenetic relationship in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: Samson, R.A. & Pitt, J.I. (eds.), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus systematics*. Amsterdam. Harwood Academic Publishers. 2000. pp.323–355.

PITT, J.I. The significance of potentially toxigenic fungi in food. *Food Technology in Australia* 36:218–219. 1984.

PITT, J.I. Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of food Protection* 56:265–269. 1993.

PITT, J.I. Fungal ecology and the occurrence of mycotoxins. In: Njapau, H., Trujillo, S., van Egmond, H.P. & Park, D.L. (eds.). *Mycotoxins and phycotoxins: advances in determination, toxicology and exposure management*. Amsterdam. Wageningen Academic Publishers. 2006. pp.33–41.

PITT, J.I. & A.D. HOCKING (ed). *Fungi and food spoilage*. 3rd ed. New York. Springer. 2009.

PRELUSKY, D.B. Residues in food products of animal origin. In: Miller, J.D. & Trenholm, H.L. (eds.). *Mycotoxins in grains*. St. Paul, Minnesota. Eagan Press. 1994. pp. 405–420.

PRELUSKY, D.B., ROTTER, B.A. & ROTTER, R.G. Toxicology of mycotoxins. In: Miller, J.D. & Trenholm, H.L. (eds.). *Mycotoxins in grains*. St Paul, Minnesota. Eagan Press. 1994. pp.359–404.

PUCHASE, I.F.H. *Mycotoxins*. Amsterdam. Elsevier. 1974.

PUEL, O., GALTIER, P. & OSWALD, I. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins* 2:613–631. 2010.

PURCHIO, A. Pesquisa de aflatoxina B₁ e ocorrência de substâncias fluorescentes similares em alguns alimentos. (Tese de Doutorado). São Paulo. Faculdade de Medicina. USP. 1969.

RAPER, K.B. & FENNELL, D.I. *The Genus Aspergillus*. Baltimore. Williams and Wilkins. 1965.

ROSENBERG, E., KRŠKA, R., WISSIACK, R., KMETOV, V., JOSEPHS, R., RAZZAZI, E. & GRASSERBAUER, M. High-performance liquid chromatography atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed. *Journal of Chromatography A* 819:277–288. 1998.

RYCHLIK, M. & SCHIEBERLE, P. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. *European Food Research and Technology* 212: 274–278. 2001.

SABINO, M., PREGNOLATTO, W & TANUS, M.T. Aflatoxina em alimentos in natura e preparados. Anais, I Congresso de Toxicologia Tropical, Manaus, AM. 1976. pp.163–174.

SAITO, M., TSURUTA, O., SIRIACHA, P. & MANABE, M. Atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated in maize fields. *Japan Agricultural Research Quarterly* 23:151–154. 1989.

SAMSON, R.A., HOUBRAKEN, J.A.M.P., KUIJPERS, A.F.A., FRANK, J.M. & FRISVAD, J.C. New ochratoxin A or sclerotium producing species of *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50:45–61. 2004.

SENYUVA, H.Z., OZCAN, S., CIMEN, D. & GILBERT, J. Determination of fumonisins B-1 and b2 in corn by liquid chromatography/mass spectrometry with immunoaffinity column cleanup: Single laboratory method validation. *Journal of International Association of Official Agricultural Chemists* 91:598–606. 2008.

SONGSERMSAKUL, P., SONTAG, G., CICHNA-MARKL, M., ZENTEK, J. & RAZZAZI-FAZELI, E. Determination of zearalenone and its metabolites in urine, plasma and faeces of horses by HPLC-APCI-MS. *Journal of Chromatography B* 843:252–261. 2006.

TANGO, J.S., MENEZES, T.J.B. & TEIXEIRA, C.G. Levantamento da ocorrência de aflatoxina em sementes de amendoim nas safras das águas e da seca. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos* 1:1–11. 1965/66.

TANIWAKI, M.H., PITT, J.I., TEIXEIRA, A.A. & IAMANAKA, B.T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology* 82: 173–179. 2003.

TANIWAKI, M.H., HOCKING, A.D., PITT, J.I. & FLEET, G.H. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 132:100–108. 2009.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission regulation (EC) no. 1881/2006–303–L364/17. *Official Journal European Union*. 2006. pp.13–14.

THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S. & GELDERBLOM, W.C.A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* 117:3–9. 1992.

URBANO, G.R., TANIWAKI, M.H., LEITÃO, M.F.F. & VICENTINI, M.C. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian Coffee. *Journal of Food Protection* 64: 1226–1230. 2001.

VARGA, J., KEVEI, E., HAMARI, Z., TOTH, B., TEREK, J., CROFT, H. & KOZAKIEWICZ, Z. Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: Samson, R.A. & Pitt, J.I. (eds), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus systematics*. Amsterdam. Harwood Academic Publishers. 2000a. pp.397–411.

VARGA, J., KEVEI, E., TOTH, B., KOZAKIEWICZ, Z. & HOEKSTRA, R.F. Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. *Canadian Journal of Microbiology* 46:593–599. 2000b.

WELKE, J.E., HOELTZ, M., DOTTORI, H.A. & NOLL, I.S. Ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle da patulina em alimentos. *Ciência Rural* 39:1–9. 2009.

WORLD AND HEALTH ORGANIZATION (WHO). Evaluation of certain mycotoxins in food. *Technical Report Series* 906:1–62. 2002.

ZÖLLNER, P. & MAYER–HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136:123–169. 2006.