

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DILLAINE HENNIG DE OLIVEIRA

**OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS EM MILHO E DERIVADOS,
DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO HUMANA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA
2016

DILLAINÉ HENNIG DE OLIVEIRA

**OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS EM MILHO E DERIVADOS,
DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO HUMANA**

Dissertação de mestrado, apresentado ao Curso de Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigo
Coelho

LONDRINA
2016

TERMO DELICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

- O48o Oliveira, Dillaine Hennig de
Ocorrência de fumonisinas em milho e derivados, destinados à alimentação humana / Dillaine Hennig de Oliveira. - Londrina : [s.n.], 2016.
40 f. : il. ; 30 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2016.
Bibliografia: f. 34-40.
1. Milho - Indústria. 2. Milho - Doenças e pragas. 3. Micotoxinas. 4. Fungos.
I. Coelho, Alexandre Rodrigo, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. III. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação Nº

**“Ocorrência de fumonisinas em milho e derivados,
destinados à alimentação humana”**

por

Dillaine Hennig de Oliveira

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Londrina, às 15h do dia 02 de setembro de 2016. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:

Prof. Alexandre Rodrigo Coelho, Dr.
(Presidente)

Profa. Elisabete Yuri Sataque Ono, Dra.
(Universidade Estadual de Londrina)

Profa. Margarida Masami Yamaguchi, Dra.
(Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

Visto da coordenação:

Prof. Fábio Augusto Garcia Coró, Dr.
(Coordenador do PPGTAL)

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos”.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, pela orientação, oportunidade, compreensão, atenção e dedicação,

À coordenação do Programa de Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos, pela disposição e pronto atendimento, quando necessário,

À todos os professores permanentes e colaboradores do Programa de Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos transmitidos durante o curso,

Aos membros da banca, pelas valiosas sugestões e recomendações para a melhoria do trabalho,

Ao meu esposo Ricardo pela compreensão, carinho, paciência e pelo incentivo de continuar quando pensava que tudo estava perdido.

RESUMO

OLIVEIRA, Dillaine H. **Ocorrência de fumonisinas em milho e derivados, destinados à alimentação humana.** 39 folhas. Dissertação de Mestrado (Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

A cultura do milho é um dos segmentos mais importantes para a economia do agronegócio brasileiro, sendo responsável por 37% dos grãos produzidos no país. Entretanto, devido ao seu alto valor nutritivo, possui grande suscetibilidade ao crescimento fúngico, com destaque para *Fusarium* sp. que além de agente deteriorante é responsável por produzir fumonisinas, um grupo de micotoxinas de caráter termoestável e possivelmente carcinogênico, associada a surtos ocorridos em equinos, suínos e aves. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de fumonisinas em milho e seus derivados durante o processo de industrialização. Um total de 1200 amostras (300 de milho, 300 de canjica, 300 de grits e 300 de farinha de milho) foram coletadas durante o processamento do milho no mês de maio de 2016 e submetidas a quantificação de fumonisinas pelo método de imunoensaio ROSA® *Fumonisin Quantitative*, cujo limite de detecção foi de 250 µg/kg. Paralelamente foram coletadas aleatoriamente 23 amostras (9 de milho e 14 de farinha), que foram submetidas simultaneamente a quantificação de fumonisinas pelo método ROSA® e pelo método Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplado a espectrometria de massa sequencial LC-MS/MS, a fim de estudar a existência de uma correlação entre os métodos. Das 1200 amostras analisadas, 370 (30,83%) apresentaram resultado positivo para fumonisinas totais, com concentrações variando de 278 a 1.522 µg/kg no milho, de 293 a 1.240 µg/kg na canjica, de 269 a 445 µg/kg no grits e de 267 a 512 µg/kg na farinha de milho. Entretanto, os teores de fumonisinas detectados no milho e derivados encontraram-se abaixo dos limites máximos tolerados pela legislação brasileira, sendo portanto, considerados aptos para consumo humano. O método ROSA® utilizado para quantificação de fumonisinas neste trabalho apresentou uma correlação de Pearson positiva forte ($r = 0,98$) com o método oficialmente empregado, indicando a possibilidade de utilização na quantificação de micotoxinas pelas indústrias processadoras, que necessitam de resultados rápidos, confiáveis e de baixo custo. Contudo, apesar dos níveis de fumonisinas detectados não representarem um risco à saúde dos consumidores, sugere-se um monitoramento constante de produtos à base de milho, tendo em vista que a contaminação por micotoxinas depende de um conjunto de fatores e representa um grande desafio para as indústrias processadoras de milho.

Palavras-chave: Grãos. *Fusarium* sp. Micotoxina.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Dillaine H. **Fumonisin occurrence in corn and derivatives, for human consumption**. 2016. 39 leaves. Dissertation (Professional Master's Degree in Food Technology) Federal Technological University of Paraná. Londrina, 2016.

The culture of corn is one of the most important segments for the economy of the Brazilian agriculture industry, being responsible for 37 % of the grains produced in the country. Therefore, due to its high nutritious value, it possesses a great vulnerability of fungus growth, especially for the *Fusarium* sp., which is a deteriorate agent and responsible for producing fumonisin, a group of mycotoxins of carcinogenic character and term stable, associated to outbreaks that reach to equine, suine and poultry and also lead to esophagus cancer in humans. Thus, the aim of this work was to evaluate the incidence of fumonisin in the corn and its derivatives during the industrialization process. A total of 1200 samples (300 maize, 300 of hominy, 300 of grits and 300 of corn flour) was collected among the processing of corn during May 2016 and submitted to fumonisin quantification by method of immunoassay ROSA® Fumonisin Quantitative Method. The detection limit was 250 µg/kg. In order to verify the existence of a Pearson correlation between two different methods for fumonisin quantification, other 23 samples (9 maize and 14 flour) were randomly collected in a parallel study, followed by fumonisin quantification by simultaneously ROSA® Fumonisin Quantitative Method and the Liquid Chromatography-Mass Spectrometry LC-MS/MS. Of the 1200 samples analyzed, 370 (30,83%) tested positive for total fumonisins with concentrations ranging 278-1.522 µg/kg in corn, 293-1.240 µg/kg in hominy, 269-445 µg/kg in grits and 267-512 µg/kg in corn flour. However, fumonisin levels detected in corn and derivatives were lower than the maximum level established by Brazilian law, and therefore able for human consumption. The ROSA® method for fumonisin quantitation used in this work showed a strong positive Pearson correlation ($r = 0.98$) with the official method employed, indicating the possibility of its use in the quantification of mycotoxins by the processing industries, that require fast, reliable and cost-effective results. Despite the detected levels fumonisins did not represent any risks to the consumers health, the corn products monitoring there must be constant, seeing that the contamination through mycotoxins depends on a group of factors and represents a great challenge to the corn manufacturing industries.

Key-words: Grains. *Fusarium* sp. Mycotoxin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	3
3 REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1 MILHO.....	4
3.2 MICOTOXINAS.....	7
3.2.1 FUMONISINAS.....	8
3.2.1.1 LEGISLAÇÃO.....	12
3.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS.....	13
3.3.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA SEQUENCIAL (LC-MS/MS).....	13
3.3.2 ENZIME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	14
3.3.3 ROSA® <i>FUMONISIN QUANTITATIVE</i>	15
3.4 ALTERNATIVAS PARA REDUÇÃO DE MICOTOXINAS.....	16
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	17
4.1 ETAPAS DE PROCESSAMENTO E CLASSIFICAÇÃO DAS FARINHAS...	17
4.2 AMOSTRAGEM.....	18
4.3 EXTRAÇÃO DE FUMONISINAS TOTAIS (FB1 + FB2).....	19
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS TOTAIS (FB1 + FB2).....	19
4.5 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO.....	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é considerado um dos principais cereais produzidos no Brasil, cuja produção na safra 2015/2016 foi de aproximadamente 70 milhões de toneladas, em uma área de aproximadamente 16 milhões de hectares. O Paraná, segundo maior produtor no ranking nacional, representa 21% da produção no país (CONAB, 2016).

A sua composição média em base seca compreende 72,0 % de amido, 9,5% de proteína, 9,0% de fibra e 4,0 % de óleo, sendo considerado um dos principais alimentos para o consumo humano e animal. O grão pode ser dividido em três partes: o pericarpo (rico em fibras), o endosperma (rico em amido) e o germen, constituído basicamente de lipídios e proteínas (PAES, 2006).

Entretanto, essa característica nutricional presente nos grãos pode favorecer o desenvolvimento de fungos filamentosos, e conseqüentemente a produção de micotoxinas. Dentre os fungos produtores, destacam-se espécies de *Fusarium* (fumonisinas e zearalenona), *Penicillium* (ocratoxina) e *Aspergillus* (aflatoxinas e ocratoxina) (KAWASHIMA; SOARES, 2006).

Fusarium verticillioides e *F. proliferatum* são as principais espécies produtoras de fumonisinas e estão associadas à ocorrência de câncer esofágico em humanos e a câncer hepático em animais (PINTO, 2005). No sul do Brasil foram relatados níveis de 66 a 7.832 µg/kg de fumonisina FB₁ e 110 a 1.201 µg/kg de fumonisina FB₂ em milho, entre os anos de 2007 a 2012 (SCUSSEL et al., 2014), enquanto que no sudeste do país Bittencourt et al. (2005) detectaram uma variação de 500 a 15.300 µg/kg de fumonisinas totais em amostras de farinha de milho, sugerindo a necessidade de adoção de práticas para reduzir esta micotoxina para níveis aceitáveis.

Em 18 de fevereiro de 2011 a ANVISA publicou a Resolução RDC N^o7, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (BRASIL, 2011a). Tal fato vem preocupando as indústrias processadoras de milho, pelas dificuldades no atendimento a esses limites, principalmente no setor de alimentação infantil.

Para reduzir os níveis de fumonisinas em milho e seus derivados, podem ser utilizados métodos físicos, químicos e biológicos. Os métodos físicos incluem

inativação térmica, luz ultravioleta, radiação ionizante ou extração com solventes, ao passo que os métodos químicos utilizam substâncias que degradam e/ou inativam estruturalmente as micotoxinas, tais como hipoclorito de sódio, agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, ozônio e bissulfito de sódio), ou até mesmo hidrolíticos (ácidos, álcalis e amônia) (SANTOS, 2014). Já os métodos biológicos empregam micro-organismos capazes de controlar o desenvolvimento fúngico e/ou degradar micotoxinas (LINO et al., 2004).

Nos alimentos processados à base de milho, os níveis de fumonisinas dependem dos processos de moagem a que o milho é submetido. Esse processo pode ocorrer por via úmida ou seca, resultando em diferentes produtos. Na moagem via úmida ocorre a separação dos componentes e obtenção de amido, proteínas, fibras e gérmen. Com a moagem via seca, são obtidas diferentes frações granulométricas, como canjicão, canjica, grits, fubá, farinha de milho, creme de milho, óleo extraído do gérmen e fibras (SCHMIELE, 2009). Segundo Soriano e Dragacci (2004), a moagem é considerada como um método preliminar na descontaminação, pois com a eliminação do germe e do pericarpo possibilita reduzir o nível de fumonisinas entre 26,2% e 64,4%.

Com base no pressuposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de fumonisinas em milho e derivados, durante as diferentes etapas de processamento, a fim de assegurar a oferta de produtos de acordo com os padrões exigidos pela legislação e paralelamente comparar o método alternativo ROSA® (*Fumonisin Quantitative*) com o método clássico Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial LC-MS/MS em algumas amostras positivas.

2 OBJETIVO

Avaliar a ocorrência de fumonisinas em milho e derivados, destinados a alimentação humana, ao longo das etapas de processamento.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração de fumonisinas (B1 + B2) em amostras de milho e derivados (canjica, grits e farinha), por meio do método ROSA® (*Fumonisin Quantitative*);
 - Avaliar comparativamente as diferenças entre os níveis de fumonisinas nos diferentes tipos de produtos analisados;
 - Comparar o método alternativo ROSA® (*Fumonisin Quantitative*) com o método clássico Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial LC-MS/MS em algumas amostras positivas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais produzidos no Brasil, sendo o país classificado na safra de 2015/2016 como o terceiro maior produtor mundial, com aproximadamente 70 milhões de toneladas produzidas (CONAB, 2016).

Consumido pelos povos americanos há milhares de anos, foi utilizado como alimentação básica por várias civilizações importantes. No Brasil era consumido pelos índios como principal alimento em sua dieta, e com a chegada dos portugueses, vários produtos novos a base de milho foram incorporados, aumentando assim o seu consumo (ABIMILHO, 2002).

É um cereal produzido em quase todos os continentes, sendo sua importância econômica caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia (PAES, 2006). Pode ser consumido diretamente ou como ingrediente na fabricação de alimentos: salgados, biscoitos, pães, cereais matinais e cerveja.

Com sua composição média em base seca de 72,0 % de amido, 9,5 % de proteínas, 9,0 % em fibra e 4,0 % de lipídeos, o milho é considerado um dos alimentos mais energéticos para o consumo humano e animal (PAES, 2006).

Seu grão é formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo e ponta, conforme apresentado na Figura 1.

O gérmen representa 11% do grão e concentra quase a totalidade dos lipídios (83%) e dos minerais (78%), além de quantidades importantes de proteínas (26%) e açúcares (70%). O pericarpo representa, em média, 5% do grão, e sua função é proteger o milho da elevada umidade ambiente, insetos e micro-organismos (PAES, 2006).

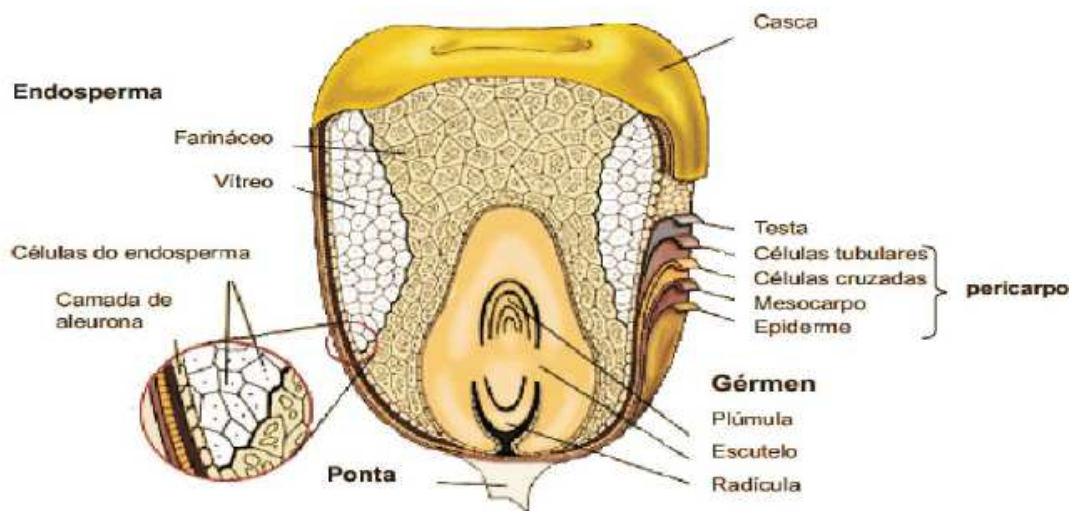


Figura 1: Anatomia do Grão de Milho
 Fonte: Paes, (2006)

O endosperma do milho, constituindo 82% do grão, pode ser classificado em duro e macio, em função da distribuição proteica no grão. No endosperma macio os grânulos de amido estão dispersos sem a formação de matriz proteica, resultando em espaços que são preenchidos por água, que se esvaziam durante o processo de secagem. Por outro lado o endosperma duro possui uma matriz proteica densa, não permitindo espaços entre as estruturas (PAES, 2006).

As etapas de pré-processamento do milho envolvem a colheita, secagem, limpeza e armazenamento dos grãos. A colheita é realizada quando o teor de umidade do grão encontra-se na faixa entre 18 e 24% de umidade. A secagem dos grãos pode ser realizada por meio de dois métodos: natural, quando os grãos são secos naturalmente na planta, ou o artificial, que se baseia na passagem forçada de ar através do produto em temperatura ambiente ou aquecido (SILVA, 2004).

A etapa de limpeza se caracteriza por processos físicos de separação por meio de peneiras classificadoras e barras magnéticas que separam o milho de impurezas (sabugos, insetos, pedras, palhas, terras e materiais estranhos). Em seguida o milho pode ser encaminhado diretamente para processamento ou armazenamento em silos (SEIBT, 2013).

A dureza do grão está relacionada com as suas características físicas e químicas, que podem ser afetadas durante sua movimentação. Os grãos podem sofrer injúrias mecânicas durante o transporte e armazenamento, bem como ataque

de insetos, que danificam o pericarpo e conseqüentemente facilitam a entrada de micro-organismos, especialmente fungos (SANTIN, 2001).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa N 60 de 22 de dezembro de 2011, define o padrão de qualidade para comercialização de grãos de milho (Tabela 1), bem como o percentual de umidade tecnicamente recomendado para fins de comercialização, que não deve ultrapassar 14% (BRASIL, 2011b).

Tabela 1. Limites máximos de tolerância (%) para classificação de grãos de milho

Enquadramento	Grãos avariados		Grãos quebrados	Matérias estranhas e impurezas	Carunchados
	Ardidos	Total			
Tipo 1	1,00	6,00	3,00	1,00	2,00
Tipo 2	2,00	10,00	4,00	1,50	3,00
Tipo 3	3,00	15,00	5,00	2,00	4,00
Fora de Tipo	5,00	20,00	> 5,00	> 2,00	8,00

Fonte: BRASIL (2011b)

A industrialização do milho consiste na maioria das vezes na quebra do grão por moagem a seco ou a úmido. O processo de moagem a seco se caracteriza principalmente por não utilizar água na degerminação, que segue para etapas de separação e redução de granulometria, gerando diferentes frações de farinhas e mantendo a grande parcela das características originais dos grãos (BENNETT; RICHARD, 1996).

Na figura 2 pode-se observar o fluxograma do processo da moagem a seco: para a produção de farinhas, após a limpeza e secagem, o milho é degerminado e moído. A moagem pode ser realizada em moinhos que possuem peneiras internas (moinho de martelo) ou em moinhos sem peneiras internas (moinho de rolos). O tipo de moinho utilizado está relacionado principalmente com as características do produto (composição, tamanho e textura) e da granulometria desejada no produto final (ABIMILHO, 2002).

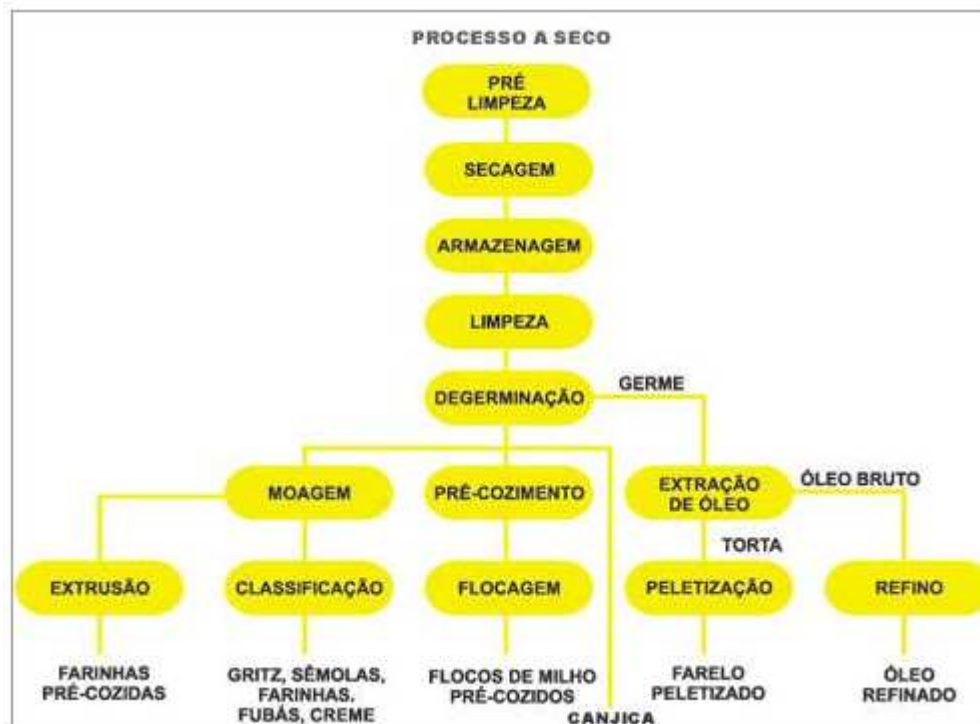


Figura 2: Processo de Moagem a seco

Fonte: ABIMILHO, 2002

Após o processo de moagem os produtos passam por peneiradores a fim de padronizar a granulometria e obter farinhas e fubás, ou extrusados para a obtenção de farinhas pré-cozidas. Além disso, pode ainda ser submetido a um pré-cozimento (sem ser moído) para a produção de flocos. Por outro lado, o germen passa por um processo de extração para produção de óleo e farelo (ABIMILHO, 2002).

3.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que podem produzir efeitos tóxicos a seres humanos e animais (MAGAN; ALDRED, 2007), cuja gravidade irá depender da toxicidade do metabólito, do tempo de exposição ao mesmo, do estado nutricional do indivíduo e de efeitos sinérgicos com outros compostos, aos quais o mesmo indivíduo está exposto (PERAICA, et al., 1999).

A partir de 1960 as micotoxinas passaram a receber importância científica, ano em que a aflatoxina foi descoberta na Inglaterra. A doença X dos perus, nome

em que a enfermidade ficou conhecida, provocou a morte de 100.000 perus, 20.000 patos e centenas de aves após ingestão de farelo de amendoim contaminado proveniente do Brasil (LANCASTER et al., 1961). Com o avanço das pesquisas, foi possível comprovar as propriedades tóxicas das aflatoxinas e a partir deste episódio, estudos sobre micotoxinas vêm ganhando destaque na saúde animal e humana (MALLMANN et al., 1999).

O principal substrato utilizado pelos fungos é o cereal, sendo o milho um dos mais suscetíveis à contaminação fúngica, provavelmente devido às características nutricionais que favorecem o seu desenvolvimento e consequentemente produção de micotoxinas (FREITAS et al., 2009).

A contaminação dos grãos de milho pelos fungos inicia-se no campo durante o seu desenvolvimento, maturação e colheita, e quando as condições são favoráveis podem ter um incremento no transporte, na moega, na secagem e armazenamento (LAZZARI, 1997). Os fatores que podem favorecer o crescimento dos fungos e consequentemente a produção de micotoxinas em cereais armazenados são: umidade alta, teor de água do substrato e temperatura de armazenamento (MALLMAN et al., 1999).

As micotoxinas passíveis de serem detectadas predominantemente no Brasil são produzidas principalmente por espécies de *Fusarium* (fumonisinas e zearalenona), seguido de *Penicillium* (ocratoxina A) e *Aspergillus* (aflatoxinas e ocratoxina A) (KAWASHIMA; SOARES, 2006).

A presença de fungos toxigênicos necessariamente não implica na produção de micotoxinas, evento intimamente relacionado à capacidade de biossíntese do fungo e das condições ambientais a que os mesmos são submetidos. Da mesma forma, a presença de micotoxinas necessariamente não implica na presença do fungo produtor, pois apresenta grande estabilidade em grãos, mesmo após eliminação do fungo produtor (PINTO, 2007).

3.2.1 FUMONISINAS

As fumonisinas foram isoladas pela primeira vez por BEZUIDENHOUT et al. (1988) e são constituídas de moléculas estruturalmente relacionadas. Pertencentes ao grupo de micotoxinas produzidas por *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F.*

nygamai e *Alternaria alternata* (LAZZARI, 1997), são conhecidas as fumonisinas B₁, B₂, B₃, B₄, A₁ e A₂ onde as principais são as B₁, B₂ e B₃ (PINTO, 2003). Embora 28 análogos tenham sido identificados (RHEEDER et al., 2002), a fumonisina B₁ representa aproximadamente 70% da contaminação total das fumonisinas detectadas e é considerada a mais tóxica (CRUZ, 2010).

A fumonisina B₁ é um diéster de propano-1, 2, 3-ácido tricarbóxico e 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroieicosano, onde nas posições C14 e C15 os grupos hidroxilas estão esterificados com um grupo carboxiterminal de propano-1,2, 3-ácido tricarbóxico. As fumonisinas B₂ e B₃ caracterizam-se pela ausência de uma hidroxila livre nas posições C10 e C5, respectivamente (Figura 3) (LINO, 2006).

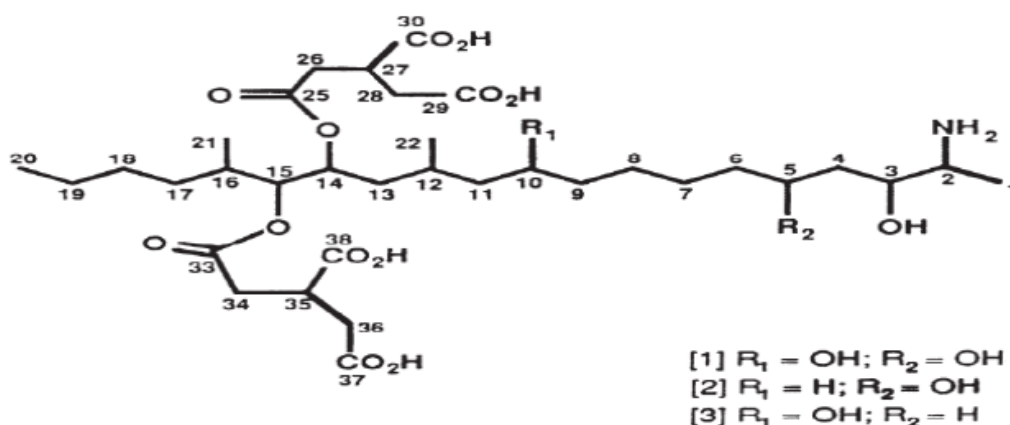


Figura 3: Estrutura química de fumonisinas e análogos
 Fonte: RHEEDER et al. (2002)

Espécies de *Fusarium*, produtoras de fumonisinas, são citadas por MILLS (1989) como as principais invasoras de grãos de milho no campo, podendo causar várias doenças, como a podridão de sementes e colmo. O pesquisador alerta que os níveis de fumonisinas podem aumentar quando as condições de armazenamento forem favoráveis ao crescimento do fungo e à produção de fumonisinas.

O milho pode ser contaminado por *F. verticillioides* de inúmeras formas, onde a mais comum ocorre pela própria planta, conforme ilustrado na Figura 4. No solo, onde se encontram resíduos da planta são produzidos esporos pelo fungo, que podem se instalar na planta por meio de vetores como insetos e ar. Estes esporos, após fixação, germinam e infectam a planta (principalmente aquelas em processo de

maturação fisiológica do grão). Os grãos podem ser infectados quando os insetos são os vetores, por escoriações da planta, falhas na cobertura das espigas, ou até mesmo por contaminação sistêmica quando as sementes já estavam contaminadas (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

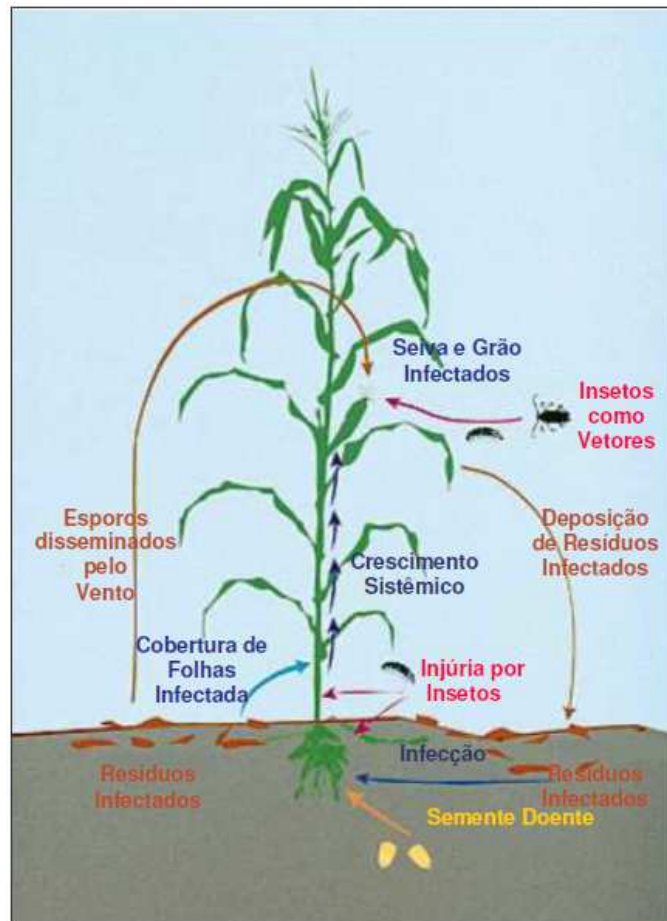


Figura 4: Possíveis vias de contaminação no ciclo da doença de *Fusarium* em milho

Fonte: MUNKVOLD; DESJARDINS (1997)

A contaminação de alimentos com fumonisinas tem sido associada a várias doenças que podem afetar a saúde em animais, entre elas a leucoencefalomácia em cavalos, edema pulmonar em suínos e toxicidade renal e hepatotoxicidade em ovelhas, ratos e coelhos (OTTONI, 2008).

O efeito tóxico das fumonisinas está relacionado principalmente com os níveis de contaminação e com o tempo de consumo do alimento contaminado. As fumonisinas são consideradas possivelmente carcinogênicas e termoestáveis,

apresentando grandes riscos para pessoas e animais domésticos que consomem milho ou subprodutos contaminados, podendo provocar náuseas, alucinações, dermatites e até mesmo a morte (LAZZARI, 1997).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou as fumonisinas como possivelmente cancerígenas a seres humanos. Segundo Marasas et al. (2004), os níveis desta micotoxina em milho estão epidemiologicamente correlacionados com alta ocorrência de câncer esofágico em seres humanos.

A ocorrência de fumonisinas em milho e em produtos derivados tem sido relatada em vários estudos realizados no Brasil. Para o milho Bittencourt, et al. (2005) encontraram resultados de até 15.300 µg/kg em amostras coletadas na região de São Paulo, ao passo que Hirooka et al. (1996) relataram níveis de fumonisina B₁ de 10.590 µg/kg e FB₂ de 10.310 µg/kg em amostras da região do Paraná.

Machinski e Soares (2000) analisaram fumonisinas totais em produtos a base de milho (farinha, canjica, farinha pré-cozida, pipoca e milho em grão) em Campinas, com níveis de até 2890 µg/kg, enquanto que KAWASHIMA (2004) encontrou até 8.600 µg/kg de fumonisina B₁ em amostras de derivados de milho (farinha, canjica, flocos pré-cozidos, fubá, pipoca e quirera) coletadas em Pernambuco. A farinha de milho proveniente dos estados de MS, PR, SC e RS apresentou uma média de 5.737 µg/kg de fumonisinas totais (SCAFF; SCUSSEL, 2004).

Ao longo dos últimos 10 anos, outros trabalhos continuam relatando a ocorrência de fumonisinas em derivados de milho. Como exemplo citam-se a contaminação de fubá de milho comercializado em Sete Lagoas-MG com níveis de fumonisinas totais de até 985 µg/kg (FERREIRA et al., 2013), amostras de farinha, flocos, canjica e pipoca comercializados em Pirassununga – SP contendo até 1.208,6 µg/kg de fumonisina B₁ (BORDIN et al., 2014) e amostras de farinha de milho atingindo níveis máximos de 2.040 µg/kg de fumonisinas totais (B₁ e B₂) no Distrito Federal (CALDAS; SILVA, 2007). No Paraná, Martins et al. (2012), relataram valores máximos de 3.462 µg/kg e 886 µg/kg de fumonisina B₁ e fumonisina B₂, respectivamente, em farinha e grits de milho.

Neste sentido, os níveis de contaminação encontrados em milho e derivados apontam para a necessidade de estudos frequentes relacionados com a ocorrência desta micotoxina em derivados de milho (SCAFF; SCUSSEL, 2004).

3.2.1.1 LEGISLAÇÃO

Em vigor desde 18 de fevereiro de 2011, a RDC nº 07 da ANVISA estabelece limites máximos de fumonisinas (FB₁+FB₂) permitidos em farinhas de milho destinados a alimentação humana e ainda cita limites mais criteriosos para a alimentação infantil (BRASIL, 2011a), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Limites Máximos Tolerados (LMT) de Fumonsina (FB₁+FB₂) permitidos em Alimentos

Micotoxina	Alimento	LMT (µg/kg) Até dez/2015	LMT (µg/kg) A partir jan/2016
Fumonisina (FB ₁ +FB ₂)	Farinha de Milho Creme de Milho Fubá Flocos Canjica Canjiquinha	2500	1500
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200	200
	Milho em grão para posterior processamento	5000	5000

Fonte: BRASIL (2011a)

Embora a RDC Nº 7 de 2011 preconize o limite de 1500 µg/kg de fumonisinas em farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica e canjiquinha a partir de janeiro de 2016, foi publicada a Resolução RDC Nº 59, de 26 de dezembro de 2013 que prorroga os prazos estabelecidos até 1º de janeiro de 2017 (BRASIL, 2013).

3.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS

O método convencional utilizado para detecção e quantificação de fumonisinas em alimentos e rações animais é o CLAE (*High Performance Liquid Chromatography*) e para quantificações mais específicas tem-se utilizado o método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) (MALLMAN et al., 2014).

Entretanto, estes métodos requerem laboratórios especializados, pessoal técnico treinado, além de serem dispendiosos e onerosos. Para atender a demanda de indústrias produtoras de alimentos foram desenvolvidos métodos alternativos (ou rápidos), que além de serem eficazes e possibilitarem resultados mais rápidos, possuem menor custo, sendo portanto uma alternativa adotada pelas empresas (ZHENG et al., 2006). Dentre os métodos rápidos utilizados para detecção e quantificação de micotoxinas, citam-se os testes ELISA (*Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay*) e ROSA® *Fumonisin Quantitative (Lateral Flow Test)*, utilizados para quantificação de fumonisinas em milho (HERRERA, 2010).

3.3.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA SEQUENCIAL (LC-MS/MS)

A cromatografia é uma técnica baseada na separação de moléculas por meio da passagem dos componentes da amostra através de um meio onde a fase estacionária é arrastada por um fluido, chamada de fase móvel e devido às moléculas da amostra possuírem diferentes afinidades e interações com a fase estacionária, ocorre à separação de moléculas (FERREIRA, 2013).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) tem sido muito utilizada no campo da análise de micotoxinas, em função do desenvolvimento de interfaces de ionização cada vez mais eficientes e do melhoramento da tecnologia dos analisadores de massa (CIGIĆ; PROSEN, 2009).

A cromatografia líquida (LC) é um método cromatográfico para a separação e a análise de misturas químicas, onde os compostos são separados passando a

mistura através de uma coluna que retém alguns compostos por mais tempo do que outros (SNYDER et al., 2010).

A espectrometria de massas (MS) transforma moléculas em estado natural em íons no estado gasoso, obtém a sua massa molecular por meio da análise da razão massa-carga sendo detectados através de exposição a campos eletrostáticos (PFLIEGER et al., 2010). Uma etapa adicional é utilizada para detecção e identificação de um composto desconhecido a partir da fragmentação de íons incluída antes da detecção e assim obter informação estrutural em uma técnica conhecida como espectrometria de massas sequencial (MS/MS) (SMITH; THAKUR, 2010).

3.3.2 *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

O método ELISA se baseia na capacidade de um anticorpo específico em distinguir a estrutura tridimensional de uma micotoxina específica (OTTONI, 2008). Envolve a competição entre a micotoxina livre no extrato da amostra (ou padrão) e a toxina fixada na microplaca pelos sítios de ligação do anticorpo, que ao estabelecer o equilíbrio de ligação, a quantidade de anticorpo que se ligou à toxina fixada depende da quantidade da toxina presente na amostra. A determinação da quantidade de anticorpo ligado à toxina fixada se realiza pela adição de um segundo anticorpo que está conjugado com uma enzima e desta forma permite sua quantificação pela realização de uma reação colorida com um substrato específico (SABINO, 1997).

Os kits de testes ELISA são satisfatórios, pois requerem pouco volume de amostra e normalmente poucos procedimentos de purificação quando comparados ao método CLAE (ZHENG et al., 2006).

Entretanto, possuem grande susceptibilidade a falsos positivos e superestimação de concentração. Anticorpos são altamente específicos para compostos que diferem acentuadamente em termos estruturais e por se tratando de compostos análogos, são comuns reações cruzadas (MOTTA & DUARTE, 2010).

3.3.3 ROSA® *Fumonisin Quantitative*

O teste “ROSA® (*Rapid One Step Assay*) *Fumonisin Quantitative*” é um ensaio de fluxo lateral que fornece um resultado quantitativo quando usado em conjunto com a leitora ROSA-M desenvolvida pela Charm Sciences (Lawrence, USA). Detecta e quantifica fumonisinas totais (B₁, B₂ e B₄) e é aprovado para milho pelo USDA-GIPSA (Certificado número COC FGIS 2013-45). A micotoxina é extraída da amostra com o emprego de Metanol 70%, onde o extrato da amostra interage com anticorpos presentes na tira, de modo que a intensidade do resultado esteja relacionada com a concentração de micotoxina na amostra. O limite de detecção do método é de 250 µg/kg (HEXIS CIENTÍFICA S/A, 2013).



Figura 5: Leitora ROSA-M, Incubadora e tira de teste – Kit ROSA® *Fumonisin Quantitative*

Fonte: HEXIS CIENTÍFICA S/A (2013)

Este método tem sido utilizado para quantificação de micotoxinas em outros países, tais como o estudo de fumonisinas realizado em amostras de milho por Herrera et al. (2010) no norte da Espanha, aflatoxina B₁ em amostras de ração para camelos na Arábia Saudita (ALMOAMMAR et al., 2014) e a ocorrência de aflatoxina, fumonisinas, desoxinivalenol e zearalenona em milho nos Estados Unidos (ROBERTSON et al., 2011).

3.4 ALTERNATIVAS PARA REDUÇÃO DE MICOTOXINAS

Mesmo com o desenvolvimento de melhorias nas técnicas de plantio, cultivo, colheita, transporte e armazenamento, a proliferação de fungos não foi eliminada e conseqüentemente a presença de altos níveis de micotoxinas em alimentos continua sendo um risco para a população.

Atualmente existem diversos métodos de descontaminação, tais como separação física de partes contaminadas, inativação térmica, irradiação, extração com solvente e utilização de micro-organismos como agentes para desativar as micotoxinas (SANTOS, 2014).

Lino, Silva e Pena (2004) relataram que as fumonisinas são de difícil eliminação, porém seus níveis em alimentos processados à base de milho são dependentes dos processos ao qual o milho em bruto é submetido. Kawashima e Soares (2006) não veem claramente estas correlações entre as concentrações de micotoxinas encontradas em milho antes e após o processamento, mas também relataram haver evidências de que os produtos processados apresentam concentrações mais baixas do que os grãos. Em uma pesquisa realizada por Scudamore e Patel (2000), uma limpeza inicial do milho reduziu a concentração de aflatoxinas em 40% e fumonisinas em 32%. Entretanto, Lazzari (1997) desaconselha a utilização dos resíduos desta pré-limpeza em rações para animais, pois os mesmos podem estar com micotoxinas em níveis elevados.

Entretanto, a eliminação do gérmen e do pericarpo do milho é considerada um procedimento preliminar na descontaminação de fumonisinas e pode reduzir seu conteúdo entre 26,2% e 64,4% (SORIANO; DRAGACCI, 2004). Desta forma, estudos adicionais envolvendo uma complementação a este método poderia melhorar consideravelmente a redução de fumonisinas nos produtos processados.

O mercado consumidor tem exigido análises de micotoxinas em geral (ABIMILHO, 2002) e com objetivo de atender suas exigências, as indústrias processadoras buscam preservar a qualidade da matéria prima e aprimorar seus processos, visando a obtenção de produtos e subprodutos de melhor qualidade (CANEPPELE, 2003).

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O estudo foi realizado nas propriedades de uma Indústria de Alimentos situada em Apucarana-PR, em um processo contínuo de moagem a seco de milho para obtenção de farinhas.

O milho utilizado para o experimento foi obtido de diferentes fornecedores situados nos estados de Mato Grosso e Paraná.

4.1 ETAPAS DE PROCESSAMENTO E CLASSIFICAÇÃO DAS FARINHAS

Na figura 5 estão apresentadas as etapas de processamento do milho, a fim de se obter a canjica, o grits e a farinha. Na etapa de condicionamento, o milho recebe água e vapor com o intuito de facilitar a separação do pericarpo e gérmen do grão, que serão retirados na etapa seguinte de degerminação.

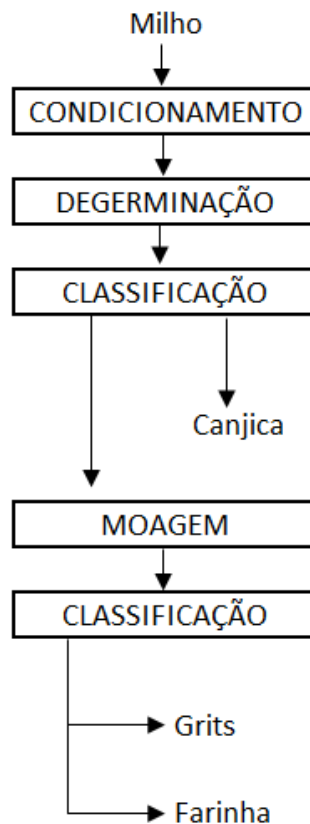


Figura 6: Etapas de processamento do milho

Fonte: autoria própria

Após o processo de degerminação, o milho é submetido a um processo de classificação granulométrica, onde ocorre a separação da canjica. O restante é submetido a uma moagem para redução da granulometria, e o produto moído é então transferido para um conjunto de peneiras com aberturas variadas, de forma a se obter grits e farinha com características distintas, de acordo com a granulometria desejada no produto.

4.2 AMOSTRAGEM

Um total de 1200 amostras foi coletado durante 25 dias no mês de março de 2016, sendo 300 amostras de cada um dos seguintes materiais: milho na entrada do processo de condicionamento (M); canjica após a etapa de degerminação (C); grits após o processo de moagem e classificação (G); e farinha após o processo de moagem e classificação (F). Cada coleta consistiu de 500g dos materiais acima mencionados.

Durante os 25 dias do mês de março, foram efetuadas 12 coletas de cada material por dia (a cada intervalo de duas horas), durante as etapas de processamento do milho, totalizando 48 amostras por dia de processamento.

O preparo da amostra de milho e canjica para análise de fumonisinas consistiu de trituração de 500 g dos materiais em moinho Fortinox, Star FT-45, até granulometria 20 mesh. Após homogeneização, foi retirado uma alíquota de 10 g para extração de fumonisinas totais e subsequente quantificação.

Em relação às amostras de grits e farinha, 10 g de cada segmento foi submetido diretamente ao processo de extração de fumonisinas totais, seguido de quantificação, conforme descrito a seguir.

Paralelamente, foram coletadas aleatoriamente 23 amostras (9 de milho e 14 de farinha de milho) no período de maio de 2015 a maio de 2016, para quantificação de fumonisinas totais empregando os métodos de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) e ROSA® *Fumonisin Quantitative*. Para tanto, 10 g de cada amostra foram separados para realizar análise através do método ROSA® e 200 g de cada amostra foram enviados para o laboratório credenciado pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) e pelo MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento):

LAMIC – Laboratório de Análises Micotoxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria.

4.3 EXTRAÇÃO DE FUMONISINAS TOTAIS (FB1 + FB2)

A partir das 1200 amostras obtidas no item 4.2, foram pesados 10 g de cada amostra em frascos de 50 mL, seguido de adição de 20 mL de metanol 70%. Em seguida, as amostras foram agitadas manualmente por 2 minutos e deixado em repouso por 3 minutos para decantação. O sobrenadante do extrato foi filtrado (papel Whatman® #1) e recolhido em um frasco Erlenmeyer de 50 mL.

Em relação às amostras enviadas para análise por LC-MS/MS, 10 g de amostra recém triturada foi transferida para um Becker, seguido de adição de 50 mL de solução acetonitrila:água (1:1, v/v). Após agitação por três minutos, as amostras foram filtradas em papel de filtro e uma alíquota de 1,0 mL do extrato foi transferido para um frasco de vidro. Foram retirados 20µL de cada amostra, sendo adicionado a esta uma alíquota de 980 µL de acetonitrila:água (50:50, v/v) e 1% de ác. fórmico para análise (MENDES et al., 2010).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE FUMONISINAS TOTAIS (FB1 + FB2)

A quantificação dos níveis de fumonisinas totais foi realizada por meio do Teste “ROSA® *Fumonisin Quantitative*”, acoplado a uma leitora ROSA-M, cujo limite de detecção da técnica situa-se em 250 µg/kg (Charm Sciences Inc., Lawrence, USA). A utilização deste método foi determinada com base na rotina e necessidades da empresa, bem como pelo fato de ser aprovado pelo GIPSA (Grains Inspeccion, Packers and Stokyards Administration), agência atrelada ao USDA (United States Department of Agriculture) nos Estados Unidos.

Uma alíquota de 100 µL do filtrado final (obtido a partir da etapa de extração de fumonisinas totais descrito no item 4.3) foi transferido para um microtubo contendo 1 mL da solução tampão Fumo Charm (fornecida pelo kit), seguido de homogeneização com agitação breve e manual. Por fim, foram transferidos

cuidadosamente 300 µL da mistura obtida, para uma tira de teste Fumo Charm, seguido de incubação a 45°C por 10 minutos.

Após o período de incubação a tira foi inserida na leitora ROSA-M (Charm Sciences Inc.), e o resultado de fumonisinas totais foi expresso em µg/kg. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Como controle positivo foi usado o padrão de fumonisina, Charm Sciences Inc. (equivalente a 700 µg/kg), ao passo que o controle negativo consistiu de metanol 70%. Os controles positivo e negativo foram realizados diariamente, com o intuito de avaliar o desempenho dos equipamentos e tiras do teste, conforme descrito pelo fabricante.

Para a realização das análises das 23 amostras por LC-MS/MS, foi utilizada a coluna Eclipse XDB C8 125 X 4 mm, sendo a fase móvel o ácido Fórmico 1 % / Acetonitrila (65:35, v/v). O tempo médio para a análise da cromatografia foi de 10 minutos e o limite de quantificação foi de 125 µg/kg. Os dados obtidos foram expressos em µg/kg.

A metodologia utilizada pelo laboratório foi realizada com o intuito de analisar a existência de uma correlação com o teste “ROSA® *Fumonisin Quantitative*” empregado neste estudo.

4.5 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

Os resultados de análise obtidos para o estudo comparativo entre os métodos de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) e ROSA® *Fumonisin Quantitative* foram avaliados utilizando o teste correlação de Pearson, por meio do programa biostat versão 5.3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 1200 amostras (300 amostras de milho em grão (M), 300 amostras de canjica (C), 300 amostras de grits (G) e 300 amostras de farinha processada(F) foi avaliado quanto à concentração de fumonisinas totais, durante o processamento em uma Indústria de Alimentos, durante 25 dias do mês de março de 2016.

A Tabela 3 apresenta um perfil geral da ocorrência de fumonisinas totais nos produtos avaliados. Do total de 1200 amostras analisadas, em 370 (30,83%) foram detectadas fumonisinas totais, com concentrações variando de 278 a 1.522 µg/kg.

Enquanto que a ocorrência de fumonisinas totais em milho (grão) foi de 60,00%, nos seus derivados esta micotoxina foi detectada em 28,67% (canjica), 4,33% (grits) e 30,33% (farinha de milho).

De maneira geral, as amostras analisadas apresentaram-se com boa qualidade, onde os resultados encontrados demonstram que atenderiam até mesmo o padrão revogado pela legislação RDC Nº 59, de 26 de dezembro de 2013.

Tabela 3: Fumonisinas totais (B₁ + B₂) em milho e seus derivados

Produto	Ocorrência (n° Positivas/Total)	Fumonisinas* (µg/kg)	Varição (µg/kg)	Mediana (µg/kg)
Milho	180/300	627	278 - 1522	548
Canjica de Milho	86/300	579	293 – 1240	505
Grits de Milho	13/300	346	269 – 445	345
Farinha de Milho	91/300	333	267 – 512	329
Total	370/1200	534	267 – 1522	441

*Valores médios obtidos a partir de 300 amostras, totalizando 1200 amostras.

A concentração média de fumonisinas nas 1200 amostras analisadas foi 534 µg/kg. Entre as amostras positivas para os derivados de milho, as concentrações mais altas foram detectadas em canjica, com nível máximo de 1240 µg/kg, seguido de farinha de milho (512 µg/kg) e grits (445 µg/kg). Em relação aos valores médios obtidos a partir de 300 amostras de cada segmento, observou-se um decréscimo de 579 µg/kg para canjica até 333 µg/kg em farinha de milho.

O decréscimo observado nos derivados de milho durante as etapas de processamento poderia ser explicado pela retirada do germen e pericarpo do milho

onde se concentram as micotoxinas no grão. Brera et al. (2004) identificaram que as maiores concentrações de fumonisinas são encontradas no germen e farelo de milho, ficando as menores concentrações nas canjicas e farinhas.

Lino, Silva e Pena (2004) ressaltaram que as fumonisinas são de difícil eliminação e que seus níveis em alimentos processados à base de milho são dependentes do processo ao qual o milho bruto é submetido. Kawashima e Soares (2006) não vêem claramente estas correlações entre as concentrações de micotoxinas encontradas em milho antes e depois do processamento, mas também afirmam que há evidências que os produtos processados apresentam concentrações mais baixas.

A Tabela 4 apresenta os resultados de análise de fumonisinas em milho em grão.

Tabela 4: Teores de fumonisinas totais (FB₁ + FB₂) em amostras positivas para Milho em Grãos

Amostra	Fumonisina* (µg/kg)	Amostra	Fumonisina (µg/kg)	Amostra	Fumonisina (µg/kg)	Amostra	Fumonisina (µg/kg)
M1	440 ± 80	M74	596 ± 113	M155	344 ± 37	M217	937 ± 42
M3	278 ± 37	M75	530 ± 70	M156	332 ± 48	M218	998 ± 72
M5	520 ± 127	M77	461 ± 41	M163	400 ± 53	M219	699 ± 40
M6	551 ± 77	M78	437 ± 34	M164	333 ± 14	M220	897 ± 84
M8	529 ± 62	M79	351 ± 37	M166	678 ± 66	M221	1333 ± 52
M9	535 ± 66	M81	293 ± 22	M167	400 ± 36	M222	1300 ± 200
M12	812 ± 66	M82	424 ± 16	M172	465 ± 23	M223	1152 ± 94
M13	348 ± 42	M83	344 ± 31	M173	660 ± 77	M224	904 ± 58
M15	390 ± 47	M84	542 ± 54	M174	279 ± 28	M225	1462 ± 78
M16	440 ± 60	M85	558 ± 46	M175	375 ± 44	M226	1437 ± 211
M17	328 ± 38	M90	643 ± 68	M176	281 ± 17	M227	630 ± 50
M18	689 ± 28	M91	657 ± 89	M178	635 ± 13	M228	1522 ± 148
M19	595 ± 101	M92	500 ± 42	M179	389 ± 45	M229	620 ± 60
M20	590 ± 68	M93	497 ± 41	M180	370 ± 49	M230	1000 ± 0
M21	968 ± 52	M94	462 ± 33	M181	669 ± 36	M231	1432 ± 58
M22	801 ± 58	M95	389 ± 26	M183	374 ± 46	M232	576 ± 84
M23	395 ± 50	M99	343 ± 37	M184	615 ± 71	M233	639 ± 60
M24	793 ± 93	M100	498 ± 59	M185	389 ± 44	M234	771 ± 51
M25	967 ± 53	M101	747 ± 50	M186	1091 ± 102	M235	1443 ± 358
M26	658 ± 24	M102	589 ± 28	M187	1153 ± 86	M236	1183 ± 116
M27	350 ± 63	M104	369 ± 24	M188	454 ± 9	M237	682 ± 17
M31	390 ± 13	M105	417 ± 18	M189	1236 ± 158	M238	374 ± 55
M34	352 ± 33	M107	416 ± 72	M190	820 ± 114	M239	719 ± 81
M35	536 ± 92	M109	327 ± 46	M191	405 ± 37	M241	521 ± 58
M36	646 ± 43	M113	372 ± 12	M192	1137 ± 65	M264	442 ± 73
M37	347 ± 49	M114	460 ± 28	M193	637 ± 25	M267	643 ± 87
M39	351 ± 34	M116	521 ± 28	M194	348 ± 42	M271	415 ± 54

*Média ± desvio padrão de triplicatas.

Tabela 4: Teores de fumonisinas totais (FB₁ + FB₂) em amostras de Milho em Grãos (continuação)

Amostra	Fumonisina* (µg/kg)	Amostra	Fumonisina (µg/kg)	Amostra	Fumonisina (µg/kg)	Amostra	Fumonisina (µg/kg)
M40	609 ± 106	M118	439 ± 36	M198	751 ± 201	M272	748 ± 61
M42	535 ± 43	M120	735 ± 74	M199	1263 ± 175	M273	457 ± 28
M47	549 ± 60	M121	491 ± 32	M200	588 ± 192	M274	685 ± 137
M49	590 ± 134	M122	437 ± 18	M201	1260 ± 153	M278	533 ± 52
M54	510 ± 14	M123	411 ± 26	M202	1133 ± 178	M282	470 ± 60
M55	386 ± 6	M126	263 ± 8	M204	474 ± 98	M288	735 ± 63
M56	322 ± 19	M130	1290 ± 103	M205	403 ± 39	M289	557 ± 60
M59	600 ± 0	M131	886 ± 6	M206	505 ± 48	M290	961 ± 58
M60	393 ± 26	M132	781 ± 117	M207	578 ± 45	M291	446 ± 67
M61	669 ± 94	M133	899 ± 8	M208	486 ± 42	M292	372 ± 28
M62	485 ± 70	M134	1192 ± 111	M209	751 ± 91	M293	714 ± 57
M63	789 ± 63	M135	981 ± 62	M210	1511 ± 140	M294	445 ± 36
M64	341 ± 47	M136	668 ± 7	M211	878 ± 38	M295	308 ± 11
M65	416 ± 63	M137	574 ± 109	M212	500 ± 44	M296	739 ± 40
M68	447 ± 46	M138	548 ± 65	M213	350 ± 0	M297	1060 ± 53
M71	775 ± 123	M148	305 ± 19	M214	460 ± 27	M298	548 ± 2
M72	314 ± 48	M149	464 ± 8	M215	802 ± 68	M299	582 ± 54
M73	317 ± 55	M150	411 ± 17	M216	712 ± 37	M300	958 ± 126

*Média ± desvio padrão de triplicatas.

De acordo com a Tabela 4 observa-se que todas as amostras que apresentaram positividade para fumonisinas encontram-se dentro do limite máximo permitido pela legislação (5000 µg/kg), com níveis médios variando de 278 ± 37 µg/kg (amostra M3) a 1522 ± 148 (amostra M228). Observa-se também que das 180 amostras positivas, 89,44% apresentaram níveis inferiores a 1000 µg/kg, indicando assim uma boa qualidade do milho em grão analisado.

A boa qualidade do milho em grão analisado neste trabalho pode estar associado a fatores climáticos, que predominaram na região durante o período de colheita e transporte, tais como a escassez de chuva, a baixa umidade relativa e temperaturas amenas, registradas no mês de maio, evidenciada pelo outono, dificultando assim a proliferação fúngica e consequente produção da micotoxina.

Em estudo preliminar realizado com 20 amostras de milho obtidas de uma fornecedora do Paraná no mês de março de 2015 as fumonisinas foram detectadas em 60% das amostras, em níveis variando de 3.000 a 6.000 µg/kg, ao passo que no mês de maio do mesmo ano apenas uma das sete amostras analisadas apresentou nível superior a 3.000 µg/kg (dados não mostrados).

Segundo Machinski Jr. e Soares (2000), elevadas temperaturas e pluviosidade intensa favorecem o acúmulo de fumonisinas em grãos de milho, quando contaminados com *F. verticilloides*, sendo que os maiores acúmulos são registrados na safra de verão. Além disso, a qualidade do milho pode ser afetada também por outros fatores, tais como a própria cultivar, o solo, a fertilização, práticas culturais e pragas, que possibilitam uma maior ou menor produção desta micotoxina (SANTIN, 2001).

Os valores de contaminação encontrados no milho são semelhantes aos encontrados em trabalhos realizados no Paraná Safra 2003/2004 (CANÇADO, 2004) e inferiores aos encontrados por Pinto et al. (2007), referente a pré-colheita safra 2011 em Minas Gerais.

Orsi et al. (2000) avaliaram a ocorrência de fumonisinas em 195 amostras de híbridos de milho no Estado de São Paulo, sendo 90,2% positivas para fumonisina B₁ e 97,4% para fumonisina B₂ com índices médios de contaminação de 9.720 µg/kg de fumonisina B₁ e 7.670 µg/kg. Bittencourt et al. (2005) encontraram níveis de até 15.300 µg/kg em amostras coletadas na região de São Paulo, ao passo que Hirooka et al. (1996) relataram níveis de 10.590 µg/kg (fumonisina B₁) e 10.310 µg/kg (fumonisina B₂) em amostras da região do Paraná. Em estudo realizado por Mendes

et al. (2010), com 10 híbridos de milho produzidos experimentalmente na safra 2007/2008, fumonisinas foram detectadas em 100% das amostras, com níveis máximos atingindo 2.074 µg/kg e 2.603,5 µg/kg, nos sistemas de plantio convencional e em plantio direto, respectivamente.

Na Tabela 5 estão apresentados os teores de fumonisinas totais (FB₁ + FB₂) nas amostras positivas para canjica.

Tabela 5: Teores de fumonisinas totais (FB₁ + FB₂) em amostras positivas para Canjica de Milho

Amostra	Fumonisina* (µg/kg)	Amostra	Fumonisina (µg/kg)	Amostra	Fumonisina (µg/kg)
C1	293 ± 9	C182	578 ± 105	C220	479 ± 105
C5	388 ± 51	C183	338 ± 74	C221	1053 ± 105
C7	343 ± 48	C185	384 ± 80	C222	1126 ± 85
C9	400 ± 89	C186	352 ± 70	C223	868 ± 84
C10	382 ± 48	C187	930 ± 73	C224	1102 ± 217
C13	441 ± 80	C190	840 ± 130	C225	516 ± 79
C16	610 ± 153	C191	761 ± 100	C226	879 ± 110
C17	300 ± 0	C193	840 ± 67	C227	652 ± 178
C19	581 ± 11	C195	334 ± 178	C228	506 ± 93
C22	1077 ± 91	C196	313 ± 209	C229	1084 ± 121
C25	963 ± 49	C198	731 ± 124	C230	463 ± 178
C26	537 ± 42	C199	1030 ± 116	C231	597 ± 104
C49	343 ± 71	C200	713 ± 125	C232	973 ± 56
C61	348 ± 32	C201	753 ± 164	C234	487 ± 49
C66	581 ± 92	C202	1093 ± 91	C235	503 ± 131
C69	304 ± 19	C205	494 ± 85	C236	1078 ± 101
C73	737 ± 102	C206	450 ± 100	C237	383 ± 72
C74	355 ± 30	C207	306 ± 26	C238	391 ± 72
C109	366 ± 17	C208	331 ± 41	C239	512 ± 140
C133	591 ± 115	C209	540 ± 128	C240	461 ± 96
C134	711 ± 118	C210	641 ± 164	C290	412 ± 75
C135	1240 ± 127	C211	1112 ± 81	C293	496 ± 48
C136	473 ± 93	C212	546 ± 64	C294	615 ± 138
C137	342 ± 12	C214	300 ± 133	C296	367 ± 66
C144	353 ± 49	C215	704 ± 125	C297	519 ± 146
C150	615 ± 76	C216	724 ± 177	C298	442 ± 101
C177	364 ± 21	C217	464 ± 97	C299	311 ± 8
C175	466 ± 50	C218	485 ± 49	C271	362 ± 55
C181	558 ± 39	C219	451 ± 48		

*Média ± desvio padrão de triplicatas.

Das 86 amostras de canjica que apresentaram fumonisinas, 10 (11,63%) estiveram acima de 1.000 µg/kg. Entretanto, todas as amostras apresentaram-se abaixo do limite máximo tolerado pela legislação em vigor, mostrando-se assim aptas para consumo humano. Os valores médios variaram de 293 a 1.240 µg/kg.

Os teores médios de fumonisinas nas 13 amostras positivas para grits de milho variaram de 269 a 445 µg/kg (Tabela 6), ao passo que os níveis médios nas 91 amostras positivas para farinha de milho variaram de 268 a 512 µg/kg (Tabela 7), sendo também inferiores aos limites máximos tolerados pela legislação, para consumo humano.

Tabela 6: Teores de fumonisinas totais (FB₁ + FB₂) em amostras positivas para Grits de Milho

Amostra	Fumonisina (µg/kg)	Amostra	Fumonisina (µg/kg)
G134	348 ± 48	G217	370 ± 32
G135	345 ± 35	G218	304 ± 5
G136	305 ± 42	G222	337 ± 17
G192	436 ± 13	G223	347 ± 28
G193	445 ± 22	G224	341 ± 21
G212	376 ± 37	G225	269 ± 8
G213	274 ± 16		

*Média ± desvio padrão de triplicatas.

Em se tratando especificamente da farinha de milho, que comumente é destinada para o consumo infantil, o limite máximo tolerado pela legislação é de 200 µg/kg. Neste contexto, analisando os resultados apresentados na Tabela 7 fica evidente que todas as amostras (100%) estariam impróprias para o consumo por este público, tornando-se assim um dado alarmante. Entretanto, 70% das amostras de farinha de milho analisadas apresentaram resultado não detectado para fumonisinas FB₁ + FB₂, necessitando de novas análises através de métodos que apresentem limite de detecção menor ou igual a 200 µg/kg, para avaliar o atendimento aos limites de fumonisinas para alimentos destinados à alimentação infantil.

Níveis semelhantes de contaminação foram observados por Ferreira et al., (2013) em fubá, farinha e canjiquinha de milho, cujos teores variaram de não

detectado a 1.000 µg/kg. Por outro lado Kawashima e Soares (2006) avaliaram 74 amostras de produto a base de milho e encontraram resultados de fumonisina B₁ entre 20 e 8.600 µg/kg.

Em estudo realizado na cidade de Campinas-SP, o fubá apresentou contaminação frequente e relativamente elevada de fumonisinas, com média de 2.290 µg/kg (MACHINSKI & SOARES, 2000), assim como Bittencourt et al. (2005) também relataram níveis elevados para o fubá comercializado na cidade de São Paulo, cuja média foi de 5.200 µg/kg.

Tabela 7: Teores de fumonisinas totais (FB₁ + FB₂) em amostras positivas para Farinha de Milho

Amostra	Fumonisina (µg/kg)	Amostra	Fumonisina (µg/kg)	Amostra	Fumonisina (µg/kg)
F2	268 ± 13	F185	317 ± 22	F218	318 ± 12
F3	280 ± 0	F186	367 ± 9	F219	381 ± 24
F6	293 ± 16	F187	303 ± 25	F220	274 ± 16
F7	307 ± 9	F188	304 ± 9	F221	350 ± 35
F8	363 ± 36	F189	267 ± 0	F222	373 ± 30
F9	262 ± 0	F190	382 ± 25	F223	322 ± 15
F10	373 ± 31	F191	371 ± 13	F224	359 ± 15
F11	359 ± 43	F192	365 ± 36	F225	336 ± 29
F14	256 ± 4	F193	345 ± 36	F226	308 ± 5
F15	290 ± 8	F194	323 ± 7	F227	332 ± 25
F17	512 ± 38	F195	320 ± 20	F228	324 ± 17
F18	292 ± 24	F196	322 ± 15	F229	376 ± 37
F19	273 ± 18	F197	383 ± 10	F230	294 ± 4
F20	325 ± 19	F198	271 ± 5	F231	290 ± 0
F21	287 ± 13	F199	364 ± 22	F232	344 ± 16
F23	312 ± 53	F200	310 ± 11	F233	317 ± 19
F26	343 ± 31	F201	340 ± 33	F234	343 ± 16
F27	347 ± 31	F202	300 ± 0	F235	369 ± 19
F28	317 ± 11	F203	333 ± 37	F236	345 ± 36
F67	329 ± 21	F204	348 ± 25	F237	380 ± 30
F74	442 ± 37	F207	319 ± 10	F238	464 ± 35
F75	283 ± 15	F208	348 ± 28	F239	428 ± 10
F134	330 ± 13	F209	288 ± 15	F240	369 ± 40
F135	331 ± 26	F210	339 ± 32	F241	456 ± 34
F136	320 ± 22	F211	322 ± 12	F242	325 ± 28
F137	370 ± 33	F212	344 ± 14	F243	282 ± 0
F138	281 ± 12	F213	351 ± 18	F298	320 ± 14
F140	288 ± 0	F214	309 ± 31	F299	366 ± 41
F170	260 ± 0	F215	352 ± 21	F300	294 ± 7
F183	384 ± 49	F216	295 ± 30		
F184	339 ± 35	F217	340 ± 13		

*Média ± desvio padrão de triplicatas.

A concentração média de 333 µg/kg detectada nas 91 amostras de farinha de milho neste trabalho foi inferior àquelas relatadas por Machinski e Soares, (2000), em farinha de milho comercializada em Campinas e Bittencourt et al., (2005) em São Paulo, cujos teores médios foram de 740 e 2.100 µg/kg, respectivamente. Consequentemente, a qualidade do produto analisado mostrou-se superior aos relatados pelos outros autores.

Paralelamente, este trabalho abordou uma metodologia analítica (LC-MS/MS) para a quantificação de fumonisinas em algumas amostras de milho e derivados, a fim de estudar a existência de uma correlação com o método ROSA®, atualmente empregado pelas indústrias.

O método ROSA® utilizado neste estudo foi comparado com o método LC-MS/MS (realizado pelo laboratório terceirizado), por meio da quantificação de fumonisinas totais ($B_1 + B_2$) a partir de 200g de 23 diferentes amostras (9 de milho em grão e 14 de farinha de milho) coletadas aleatoriamente, no período de maio de 2015 a maio de 2016. Os teores de fumonisinas estão apresentados na Tabela 8.

Os teores de fumonisinas detectados pelo método ROSA® variaram de 555 a 2.077 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 251 a 1.711 $\mu\text{g}/\text{kg}$, nas amostras de milho e farinha, respectivamente. Por outro lado, o método LC-MS/MS detectou uma variação de 334 a 2.108 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e de 259 a 1.556 $\mu\text{g}/\text{kg}$, nas amostras de milho e farinha, respectivamente.

De maneira geral, os teores de fumonisinas detectados em 78,26 % das amostras pelo método ROSA® apresentaram-se superiores (amostras de milho A, B, C, D, E, H e I, e amostras de farinha A, B, C, D, E, F, G, I, J, K e L) aos obtidos pelo método LC-MS/MS. A diferença entre os resultados obtidos pelas duas metodologias poderia ser explicado pelos métodos empregados na extração da fumonisina. O metanol 70% utilizado pelo método ROSA® supostamente proporcionou uma melhor extração da micotoxina, quando comparado com a mistura acetonitrila:água (1:1, v/v) empregada no método utilizado para quantificação por LC-MS/MS. Para que a comparação entre os métodos pudesse ser melhor analisada, sugere-se que os métodos de extração sejam realizados nas mesmas condições.

Tabela 8: Determinação de Fumonisinias (FB₁ + FB₂) em milho e seus derivados

Amostra	Fumonisinina (µg/kg) LC-MS/MS	Fumonisinina (µg/kg) Kit ROSA®
Milho A	1306	1500
Milho B	1008	1320
Milho C	1273	1359
Milho D	334	410
Milho E	1051	1300
Milho F	2108	2077
Milho G	1238	1109
Milho H	480	555
Milho I	948	1137
Farinha A	909	1045
Farinha B	621	669
Farinha C	259	288
Farinha D	609	676
Farinha E	659	701
Farinha F	698	733
Farinha G	1556	1711
Farinha H	280	251
Farinha I	344	381
Farinha J	511	534
Farinha K	404	443
Farinha L	256	270
Farinha M	733	656
Farinha N	310	300

Os resultados obtidos para o estudo comparativo foram submetidos ao teste de correlação de Pearson, por meio do programa biostat versão 5.3. O coeficiente de correlação obtido foi $r = 0,98$, o que demonstrou uma correlação positiva forte (Figura 7).

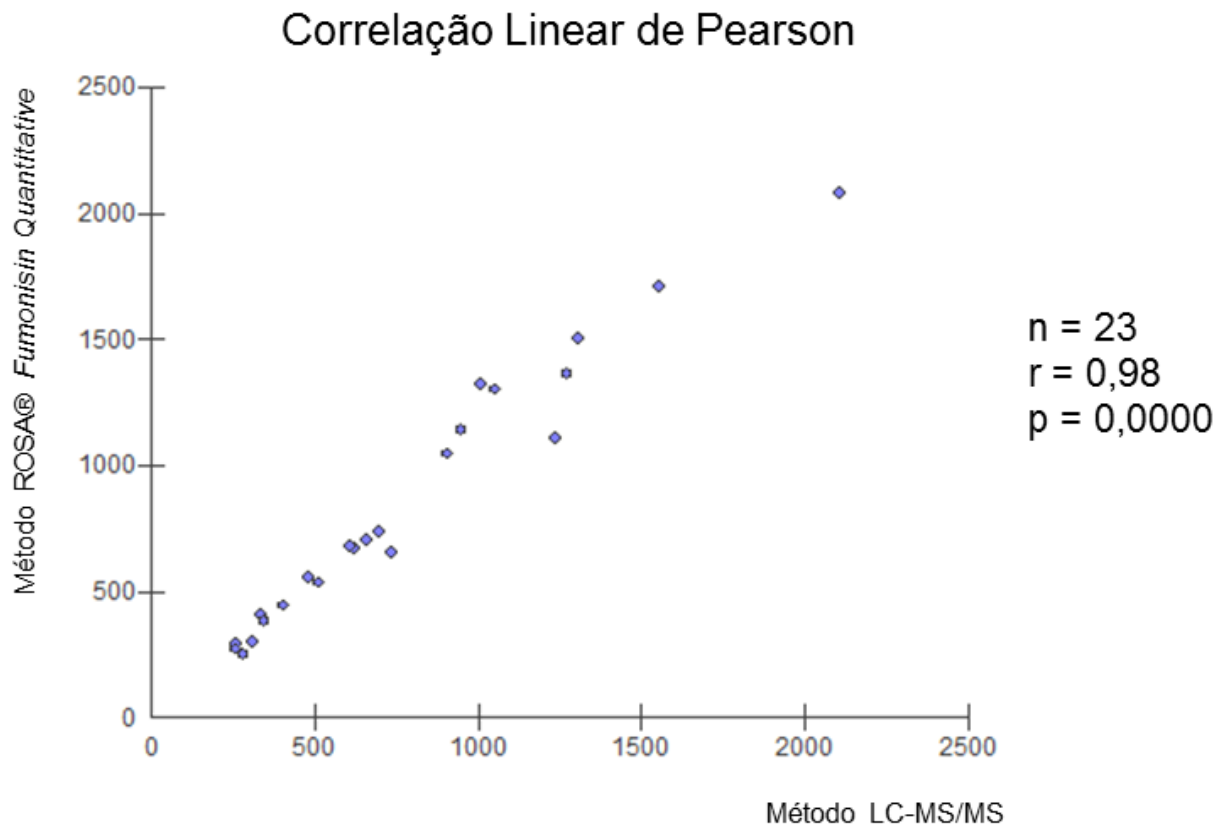


Figura 7: Correlação Linear de Pearson entre os métodos de análise LC-MS/MS e Kit ROSA® *Fumonisin Quantitative*

Um estudo realizado por Bowers et al. (2014), comparando os resultados de fumonisinas detectados pelos métodos ELISA e HPLC, também observaram a existência de uma correlação forte ($r=0,95$ e $p<0,0001$), sendo os níveis de fumonisinas detectados pelo método ELISA superiores aos encontrados pelo método cromatográfico (HPLC).

A forte correlação obtida entre os métodos sugere a possibilidade de se empregar métodos alternativos para quantificação de fumonisinas em milho e derivados, tendo em vista a necessidade das indústrias processadoras na emissão de resultados rápidos, confiáveis e de custo acessível. Entretanto, recomenda-se que sejam realizados estudos adicionais, envolvendo um maior número de amostras, bem como outros derivados de milho, e metodologia de extração da fumonisina nas mesmas condições.

6 CONCLUSÃO

A ocorrência de fumonisinas totais foi detectada em 370 das 1200 amostras analisadas, sendo o milho o responsável pela maior ocorrência (60,0%), seguido de canjica (28,67%), farinha de milho (30,33%) e grits (4,33%).

Todas as amostras de milho e derivados positivos para fumonisinas apresentaram níveis abaixo do limite máximo tolerado pela legislação, indicando boa qualidade da matéria-prima e dos produtos, sendo portanto considerados aptos para o consumo humano em relação as fumonisinas. Para avaliar o atendimento aos limites especificados para alimentação infantil, pesquisas futuras são necessárias utilizando métodos de análise com limite de detecção menor ou igual a 20 µg/kg.

Apesar dos níveis de fumonisinas obtidos neste trabalho se apresentarem baixos, sugere-se um constante monitoramento da matéria-prima e dos produtos à base de milho, haja visto que a contaminação por micotoxinas depende de um conjunto de fatores, o que torna um grande desafio para as indústrias processadoras de milho, no sentido de atender a legislação brasileira.

O método ROSA® utilizado para quantificação de fumonisinas neste trabalho apresentou uma alta correlação positiva ($r = 0,98$) com o método oficialmente empregado, indicando a possibilidade de utilização na quantificação de micotoxinas pelas indústrias processadoras, que necessitam de resultados rápidos, confiáveis e de baixo custo. Entretanto, sugerem-se estudos posteriores envolvendo um número expressivo de amostras a fim de reforçar os resultados deste trabalho.

O conhecimento dos níveis de contaminação por fumonisinas no milho se torna muito importante para tomada de decisão, levando em consideração a qualidade do milho disponível no mercado. Por fim, ressalta-se a necessidade de inserção de métodos alternativos no monitoramento de micotoxinas e desta forma facilitar o controle nas indústrias de processamento.

REFERÊNCIAS

- ABIMILHO . Associação Brasileira das Indústrias Moageiras de Milho. Colheita, recebimento, limpeza, secagem e armazenamento de milho. **ABIMILHO**. Apucarana (PR), 2002.
- ALMOAMMAR, Hassan, et al. Fungal Infestation and Mycotoxin Contamination in Camel Feedstuffs. **Fungal Genom Biol.**v. 4, 2014.
- BENNETT, G. A.; RICHARD, J. L. Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. **Food Technology**. Chicago, v.50, n.5, p.235-238, 1996.
- BEZUIDENHOUT, S. C., et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**. 1988; 11:743-45.
- BITTENCOURT, A. B. F., et al. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**. v.16, p.117-120, 2005.
- BORDIN, K., et al. Assessment of dietary intake of fumonisin B1 in São Paulo, Brazil. **Food Chemistry**. v.155, p.174-178, 2014.
- BOWERS, E.; HELLMICH, R.; MUNKVOLD, G. Comparison of Fumonisin Contamination Using HPLC and ELISA Methods in *Bt* and Near-Isogenic Maize Hybrids Infested with European Corn Borer or Western Bean Cutworm. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.62, p.6463-6472, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011. Dispõe limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 mar. 2011a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 60, de 22 de Dezembro de 2011. Regulamento Técnico do Milho. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 dez. 2011b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 59, de 26 de Dezembro de 2013. Prorrogação dos prazos estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução da Diretoria Colegiada RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011 que

dispões limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 dez. 2013.

BRERA, C., et al. Effect of industrial processing on the distribution of fumonisin B1 in dry milling corn fractions. **Journal of Food Protection**. v.6, p.1261-1266, 2004.

CALDAS, E. D.; SILVA, A. C. S. Mycotoxin in Corn-Based Food Products Consumed in Brazil: An Exposure Assesment for Fumonisin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.55, p.7974-7980, 2007.

CANÇADO, R. A. **Avaliação microbiológica e micotoxicológica de grãos de milho (*Zea mays Linné*) e soja (*Glycinemax. (Linné) Merrill*) provenientes de cultivo convencional das sementes naturais e geneticamente modificadas**. 2004. 148 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CANEPPELE, C. **Qualidade do grão de milho (*Zea mays L.*) da pré-colheita ao armazenamento, métodos de monitoramento e controle de insetos**. 2003. 120 f. Monografia (Pós Graduação em Ciências Biológicas) . Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

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

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira Grãos**. V.3 – Safra 2015/16, n.10, p. 1-179, 2016.

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

FERREIRA, A. S. **Validação e Determinação de Tebromina em amostras de cacau e seus derivados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. 2013. 74f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia. Univesidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

FERREIRA, P., et al. Incidência de Aflatoxinas e Fumonisinias em Produtos de Milho consumidos no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.12, n.1, p.54-60, 2013.

FREITAS, M. B., et al. Produtividade e incidência de grãos ardidos em híbridos de milho cultivados no sudoeste de Goiás. **Agrarian**, Dourados, v.2, n.4, p.73-81, abr./jun. 2009.

GARRIDO, C. E., et al. Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.), from 1999 to 2010. **Food Control**, v.25, p.660-665, 2012.

HERERRA, M., et al. Fumonisin concentration in maize affected by physico-chemical, environmental and agronomical conditions. **Maydica**, Espanha, v.55, p.121-126, 2010.

HEXIS CIENTÍFICA S/A. **Manual do usuário: Teste ROSA® Fumonisinia para grãos**. 2013.

HIROOKA, E. Y., et al. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**. London, v.13, n.2, p.173-183, 1996

KAWASHIMA, L. M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2004. 95 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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. **Ciências Tecnológicas Alimentos**, Campinas, v.26, n.35, p.516- 521, jul./set. 2006.

LANCASTER M.C.; JENKINS F. P.; PHILP J. M. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, London, v.192, p. 1095-1096, 1961.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e Rações**. 2. ed. Curitiba: Ed. do Autor, 1997.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Fumonisinias: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n. 552, p.181-192, 2004.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Metodologias analíticas para determinação das fumonisinas em milho e alimentos à base de milho. **Química Nova**, v.29, n.1, p.293-299, 2006.

MACHINSKI JR., M.; VALENTE SOARES, L. M. Fumonisin B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 10, p. 875-879, 2000.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.119, n.1-2, p.131-139, 2007.

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

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; MALLMANN, A. O. Panorama das Micotoxinas. **VI Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal**. CBNA – Estância de São Pedro, SP. 2014.

MARASAS, W. F. O., et al. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin contaminated maize. **J. Nutr.**, v. 134, p. 711-716, 2004.

MARTINS, Fernanda A. et al. Daily intake estimates of fumonisins in corn-based food products in the population of Parana, Brazil. **Food control**, vol. 26, p.614-618, 2012.

MENDES, M. C., et al. Qualidade de grãos e produção de fumonisina em híbridos de milho inoculados com *Fusarium verticillioides* em diferentes sistemas de manejo. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**. Associação Brasileira de Milho e Sorgo, Goiânia. 2010.

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

MOTTA, Thiago P.; DUARTE, Keila M. R. ELISA na detecção de aflatoxinas em alimentos. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, v. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 189, 2010.

MUNKVOLD, G.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in Maize – Can we reduce their occurrence?. **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.

ORSI, R. B., et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**. v.36, p.75-87, 2000.

OTTONI, J. R. **Análise da incidência de *Fusarium* spp. Toxicogênico e de níveis de fumonisinas em grãos ardidos de milho híbrido**. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Ministério da Agricultura, Pecuária e do abastecimento**, Sete Lagoas, 1. ed, 2006.

PERAICA, M., et al. Toxic effects os mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 77, p. 754-766, 1999.

PFIEGLER, D.; FOREST, E.; VINH, J. Mass spectrometry. In: BOISSEAU et al (eds.). **Nanoscience**. Berlin: Springer-Verlag, 2010. p. 595-638.

PINTO, N. F. J. A., et al. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase pré-colheita. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 33, n. 3, p.304-306, 2007.

PINTO, N. F. J. A. Qualidade sanitária de grãos de sorgo. **Ministério da Agricultura, Pecuária e do abastecimento**, Sete Lagoas, 1. ed. 2003.

PINTO, N. F. J. A. Grãos Ardidos em Milho. **Ministério da Agricultura, Pecuária e do abastecimento**, Sete Lagoas, 1. ed., 2005.

RHEEDER, John A., et al. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. **Applied an Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n. 5, p.2101-2105, 2002.

ROBERTSON, A. E., et al. Effects os Natural Hail Damage on Ear Rots, Mycotoxins, and Grain Quality Characteristics of Corn. **Agronomy Journal**. v. 103, p.193-199, 2011.

SABINO, M., et al. Avaliação da eficiência de dois kits comerciais para detecção de Aflatoxina B1 em amostras de milho, ração e amendoim e seus produtos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.107-110, 1997.

SANTIN, J. A. **Fungos de pós colheita e a qualidade de grãos de milho**. 2001. 200 f. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2001.

SANTOS, M. C., et al. Micotoxinas e seu potencial como Agente de Guerra. **Revista Virtual de Química**, v.6, n.3, p.761-778, 2014.

SCAFF, R. M. C.; SCUSSEL, V. M. Fumonisin B1 and B2 in Corn-Based Products Commercialized in the State of Santa Catarina – Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.6, p.911-919, 2004.

SCHMIELE, M. **Caracterização das Frações com Diferentes Granulometrias de Milho Dentado e Duro e Avaliação na Qualidade de Extrusados Expandidos**. 2009. 223 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2009.

SCUDAMORE, K. A.; PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 5, p. 407-416, 2000.

SCUSSEL, V. M., et al. Fumonisin in corn (*Zea mays* L.) from Southern Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B, Surveillance**, v. 7, p.151-155, 2014.

SEIBT, E. J., et al. Critérios técnicos para ampliação de uma unidade de beneficiamento de sementes de milho. **Informativo ABRATES**, Pelotas, v.23, n.3, p.65-72, 2013.

SILVA, L. C. Secagem de Grãos. **Grãos Brasil: Da semente ao Consumo**, Maringá, Ano 3, n.14, p. 10.14, maio de 2004.

SMITH, J. S.; THAKUR, R. A. Mass spectrometry. In: NIELSEN, S. S. **Food Analysis**. New York: Springer, 2010. p. 457-470.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3 ed. New Jersey: Wiley, 2010. 912 p.

SORIANO, J. M.; DRAGACCI, S. Intake, descontamination and legislation of fumonisin in foods. **Food Research International**, Canadá, 37 (4), p. 367-374, 2004.

STACK, M. E.; EPPLEY, R. M. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1 and B2 in corn and corn based products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.75, p.834-837, 1992.

ZHENG, M. Z.; RICHARD, J. L., BINDER, J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. **Mycophatologia**, New York, v. 161, p. 261-273, 2006.