

Procedimentos para colheita de amostras e análises laboratoriais de micotoxinas presentes em dietas humanas e animais

Janaína Nones^{1*}, Geovana Dagostim Savi², Larissa Ferrari Pereira¹, Rogério Frozza³, Humberto Gracher Riella¹, Jader Nones⁴

¹*Pesquisador (a) da Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis – SC Brasil. E-mail: janaina.nones@posgrad.ufsc.br*

²*Pesquisadora da Universidade do Extremo Sul. Criciúma –SC Brasil E-mail: geovanasavi@gmail.com*

³*Médico veterinário e consultor técnico, especialista em avicultura. E-mail: rogerio.frozza@sanphar.net*

⁴*Pesquisador da Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética, Florianópolis – SC Brasil. E-mail: jadernones@gmail.com*

*Autor para correspondência

RESUMO. Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas pelo metabolismo secundário de fungos filamentosos e capazes de desencadear uma série de problemas relacionados à produção agropecuária e à saúde pública. O monitoramento destes agentes tóxicos é necessário, devendo-se levar em consideração para realização de tal atividade a diversidade das amostras que são colhidas, os tipos distintos de micotoxinas, bem como a distribuição não uniforme destes contaminantes. A escolha adequada dos pontos de amostragem, bem como do uso de uma metodologia eficaz que considere os possíveis interferentes e contemple os níveis de detecção esperados também são fatores indispensáveis para o sucesso e confiabilidade das análises realizadas. Com o intuito de atender às exigências da legislação brasileira para micotoxinas, vários alimentos deverão ser analisados, para isso, o conhecimento de procedimentos para colheita de amostras e análises laboratoriais são importantes para pequenos produtores e para indústria de alimentos. Considerando que a aplicação adequada destas metodologias não apenas pode aumentar a produção agrícola e sua consequente lucratividade, como também propiciar a segurança alimentar dos diversos produtos brasileiros destinados às dietas humanas e/ou animais, esta revisão visa descrever as principais metodologias existentes no Brasil para colheita de amostras e análise de micotoxinas, assim como abordar os principais métodos analíticos existentes para detecção e quantificação destes contaminantes.

Palavras chave: Alimentos, amostragem, análises laboratoriais, metodologias analíticas

Procedures for sampling and laboratory tests of mycotoxins existing in human and animals feed

ABSTRACT. Mycotoxins are toxic substances produced by the secondary metabolism of filamentous fungi and able to trigger series of problems related to agricultural production and public health. Thereby, monitoring of toxic agents is absolutely necessary and must be taken into account for the performance of such activity the diversity of samples to be collected, the different types of mycotoxins as well as the non-uniform distribution of these contaminants. Proper selection of sampling process as well as the use of a effective methodology will eliminate the trace of interference in order to have a successful analyses. Thus, in order to meet the requirements of the current Brazilian legislation for mycotoxins, various foods should be analyzed for this, knowledge of procedures for sampling and laboratory analyzes are of fundamental importance to both small producers and for the food

industry . Whereas the proper application of these methodologies can not only enhance agricultural production and its profitability, but also regulate the food process for many Brazilian products that intended to be used by human and animals, this review aims to describe the main methods the exist in Brazil like sample collecting and analysing of mycotoxins, as well as to address the main analytical methods for detection and quantification of these contaminants.

Keywords: Food, sampling, laboratory analysis, analytical methodologies

Procedimientos para colecta de muestras y análisis de laboratorio de micotoxinas presentes en dietas humanas y animales

RESUMEN. Micotoxinas son sustancias tóxicas producidas por el metabolismo secundario de hongos filamentosos y capaces de desencadenar una serie de problemas relacionados con la producción agropecuaria y la salud pública. Por eso, es necesario monitorear esos agentes tóxicos, teniendo en cuenta para la realización de esa actividad la diversidad de las muestras que se colecta, los distintos tipos de micotoxinas, así como la distribución no uniforme de dichos contaminantes. La selección adecuada de los puntos de muestreo, bien como del uso de una metodología eficaz que considere los posibles interferentes y contemple los niveles de detección esperados también son factores indispensables para el éxito y confiabilidad de los análisis realizados. Con el fin de atender a las exigencias de la legislación brasileña para micotoxinas, se deberá analizar varios alimentos. Para eso, es importante para los pequeños productores y para la industria de alimentos conocer los procedimientos para la colecta de muestras y análisis de laboratorio. Teniendo en cuenta que la aplicación apropiada de esas metodologías no sólo puede incrementar la producción agrícola y su consecuente rentabilidad, sino también propiciar la seguridad alimentaria de los diversos productos brasileños destinados a la ingesta humana y/o animal, esta revisión tiene como objetivo describir las principales metodologías existentes en Brasil para la colecta de muestras y análisis de micotoxinas, así como abordar los principales métodos analíticos existentes para la detección y cuantificación de esos contaminantes.

Palabras clave: Alimentos, muestreo, análisis de laboratorio, metodologías analíticas

Introdução

Micotoxinas são substâncias naturais de elevada estabilidade térmica e química, sendo produzidas pelo metabolismo secundário de fungos filamentosos ([Zöllner and Mayer-Helm, 2006](#), [Serrano et al., 2013](#), [Gong et al., 2015](#), [Flores-Flores et al., 2015](#)). De forma geral, são substâncias caracterizadas por uma estrutura complexa, com uma grande diversidade de grupos funcionais (Figura 1) ([Tomašević-Čanović et al., 2003](#)). As estruturas variam de simples anéis heterocíclicos com massa molar de 50 g/mol até grupos de 6 a 8 anéis heterocíclicos dispostos irregularmente com massa molar acima de 500 g/mol ([Pitt, 2000](#)). Devido a esta diversidade, centenas de moléculas de micotoxinas já foram descritas, sendo as aflatoxinas (AFLs), fumonisinas (FBs), ocratoxinas (OTA), deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZON) os grupos de maior ocorrência e relevância para

saúde pública e animal ([Kumar et al., 2008](#), [Ahlberg et al., 2015](#)).

Estes contaminantes alimentares podem desencadear uma série de distúrbios, uma vez que apresentam quatro tipos principais de toxicidade: aguda, crônica, mutagênica e teratogênica. Na intoxicação aguda, os efeitos mais comuns são danos na função renal e hepática, podendo levar a morte. Podem interferir na síntese de proteínas, produzir efeitos relacionados ao dano celular e necrose de tecidos e causar imunodeficiência ao indivíduo. Além disso, podem atuar como neurotoxinas, causando tremores, danos cerebrais irreversíveis e em casos mais graves podem inclusive ocasionar a morte. Em humanos, por exemplo, as micotoxinas estão relacionadas principalmente com o desenvolvimento de carcinomas. [Liu and Wu \(2010\)](#) descreveram que 4,6 a 28,2% de novos casos de câncer hepatocelular mundiais podem estar relacionados à exposição de micotoxinas ([Nones et al., 2013](#),

[Nones and Scussel, 2013](#), [Oliveira et al., 2014](#), [Nones et al., 2015](#)). Além disso, podem afetar a replicação do DNA e produzir efeitos mutagênicos

e teratogênicos ([Pitt, 2000](#), [Zöllner and Mayer-Helm, 2006](#), [Bryden, 2012](#), [Peluque et al., 2014](#), [Bennett and Moore, 2015](#)).

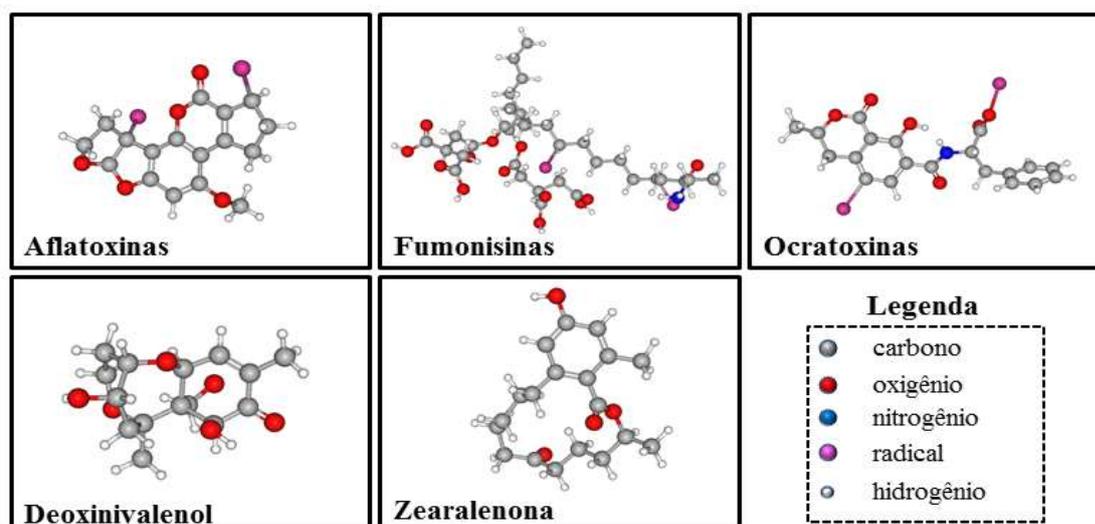


Figura 1. Estrutura química das micotoxinas.

Quando presente nas dietas fornecidas aos animais, as micotoxinas podem desencadear alterações nas taxas de concepção, abortos e aparecimento de fetos mumificados. Além disso, podem provocar o desencadeamento de quadros mais severos, como doenças renais e edemas pulmonares ([Nones and Scussel, 2013](#), [Nones et al., 2014](#), [Zachariasova et al., 2014](#)). Não obstante, comumente podem ser visualizados na produção animal quadros de doenças provocadas pela baixa imunidade, fato relacionado com a exposição permanente dos animais a dietas contendo a presença de micotoxinas.

No que concerne à produção vegetal, estas substâncias provocam perdas recorrentes associadas à baixa na produtividade e na qualidade nutricional dos grãos produzidos ([Degraeve et al., 2016](#)). Além disso, contaminações fúngicas e/ou de micotoxinas podem causar alterações no sabor dos grãos, bem como contribuir para a perda de matéria seca, por meio da utilização de carboidratos como fonte de energia, degradação de lipídeos e proteínas, produção de metabólitos voláteis e compostos alergênicos ([Cabral et al., 2013](#)).

De acordo com a [FAO \(2013\)](#), aproximadamente 25% dos alimentos produzidos mundialmente estão contaminados por micotoxinas. Esta contaminação pode ocorrer desde o campo, durante a produção ou colheita, até o armazenamento e processamento de subprodutos de origem vegetal e animal ([Gutleb et](#)

[al., 2015](#)). Dentre os alimentos mais afetados, podemos destacar principalmente os cereais, nozes, frutas secas, café, cacau, castanhas, leguminosas, frutas e produtos de origem animal, como ovos, leite e carne. Além disso, é importante destacar que após a formação das micotoxinas nos alimentos, estas podem permanecer nos seus subprodutos, já que são moléculas estáveis e resistentes a diferentes etapas do processamento, tais como moagem e aquecimento.

Devido à ampla variedade de matrizes agrícolas e biológicas consideradas suscetíveis à contaminação por micotoxinas faz-se necessário a criação e utilização de métodos altamente seletivos e exatos para identificação e quantificação destes contaminantes ([Zöllner and Mayer-Helm, 2006](#), [Maestroni et al., 2011](#)). No entanto, considerando as várias situações que podem ser encontradas quanto à análise de micotoxinas em diferentes matrizes alimentares, escolher um método analítico ideal não é uma tarefa fácil. Em uma mesma matriz alimentar pode ser detectado mais de uma toxina com estruturas químicas variadas, o que dificulta encontrar um método único para a realização da análise. Cabe ressaltar que, para uma quantificação eficaz destes agentes contaminantes, métodos de análise precisam considerar não somente as diferenças estruturais e químicas das micotoxinas, como também a distribuição não uniforme destas possíveis contaminações. Além disso, a ausência de uniformidade é também encontrada no próprio

alimento. Geralmente as micotoxinas tendem a se concentrar nas camadas mais externas dos alimentos, onde o fungo tem uma maior proliferação. Já que em camadas internas, os níveis de micotoxinas são menores, devido o menor crescimento do micélio fúngico ([Savi et al., 2016a](#), [Savi et al., 2016b](#), [Tibola et al., 2016](#), [Tibola et al., 2015](#)). Por isso, é necessário a análise de cada caso em específico, levando em consideração especialmente a matriz alimentar e o tipo de micotoxina que será analisada.

Com o intuito de discutir métodos de aplicação para análise de micotoxinas em dietas fornecidas à humanos ou animais, o objetivo desta revisão é descrever os principais e mais adequados procedimentos para a realização da colheita de amostras destinadas a análises laboratoriais, assim como relatar os principais métodos analíticos utilizados para detecção e quantificação destes agentes toxigênicos.

Metodologias para colheita de amostras e análises laboratoriais

Para a escolha adequada das metodologias de colheita de amostras e das análises laboratoriais que serão posteriormente realizadas, objetivando a detecção e/ou quantificação de micotoxinas, é preciso considerar que agentes contaminantes presentes nos alimentos ou nas amostras biológicas geralmente estão distribuídos de forma não homogênea ([Stroka et al., 2004](#), [Coppock and Jacobsen, 2009](#), [Santos et al., 2014](#), [Preedy, 2014](#)). Além disso, as matrizes alimentares e biológicas apresentam uma elevada complexidade em suas composições ([Pereira et al., 2014](#)).

Considerando tamanha complexidade e diversidade das matrizes alimentares e biológicas é preciso realizar uma sequência de três operações fundamentais visando a confiabilidade dos resultados obtidos, as quais incluem: 1) Realização das colheitas das amostras de forma adequada; 2) Preparação eficaz das amostras antes da realização da análise propriamente dita e 3) Aplicação do método analítico correto visando a detecção e/ou quantificação destas substâncias ([Betina, 1993](#), [Binder, 2007](#), [Valle-Algarra et al., 2014](#)).

Procedimentos para realização da colheita de amostras

A colheita de amostras é a etapa de análise que pode apresentar a maior variabilidade na quantificação das micotoxinas encontradas, e por

isso, deve ser realizada de forma eficiente ([Mallmann et al., 2014](#), [Armorini et al., 2015](#)). [Whitaker et al. \(1997\)](#), por exemplo, relataram que a contaminação por FBs em lotes de milho chegou a apresentar 61% de variância entre os lotes, em decorrência do lugar de onde foi obtida a amostra. Em alguns casos, a variabilidade da contaminação por AFLs em amêndoas e avelã atingiu até 96,2 e 99,4% devido a amostragem, como observado por [Whitaker et al. \(2006\)](#) e [Ozay et al. \(2006\)](#), respectivamente. Assim sendo, para que uma amostragem possa fornecer informações verídicas sobre uma eventual contaminação em um lote, é de suma importância que a mesma seja considerada representativa. Uma amostra representativa somente é adquirida pelo planejamento adequado de colheita, o qual deve levar em consideração o tipo de produto que será avaliado, qual método analítico que será empregado, quantas amostras precisarão ser colhidas, assim como o número de medições que precisarão ser realizadas ([Cheli et al., 2014](#)). Além disso, é preciso planejar e considerar a viabilidade de todo este processo, ou seja, o método escolhido deverá ser de fácil aplicação, rápido, eficaz e de baixo custo.

No Brasil, os métodos de colheita de amostras de origem vegetal e animal destinados ao consumo humano são baseados no *Codex alimentarius* ([MAPA, 2013](#)).

Para que a colheita de uma amostra seja considerada representativa precisam ser empregadas metodologias que levem em consideração o tipo de alimento, a forma de armazenamento, o tempo de armazenamento e a distribuição não uniforme das micotoxinas nos lotes. A amostragem deve ser representativa, aleatória e não tendenciosa. Amostras elementares devem ser retiradas de vários pontos cobrindo completamente o lote. Os coletores devem ser definidos de acordo com o local da coleta, o tipo de alimento e deverão ser adequados para coletar as amostras elementares (gramas), atingindo o máximo de profundidade dos lotes (sacas, pacotes ou silos). Após, deve ser realizado o cálculo de frequência de amostragem que leva em consideração a massa do lote, a massa da amostra global e a massa da amostra elementar, realizado de acordo com [MAPA \(2013\)](#).

Desta forma, as matrizes alimentares enviadas ao laboratório para a detecção e quantificação de micotoxinas são formadas por inúmeras amostras elementares, as quais compõem a amostra global

(Figura 2). É necessário também verificar a quantidade mínima (gramas) da amostra individual que o laboratório irá receber para realizar a análise e qual a temperatura de transporte em que a amostra deverá ser enviada.

Cabe ressaltar, no entanto, que muitas vezes não é possível a realização do processo de colheita de amostras porque as consequências econômicas são inconcebíveis, como, por exemplo, a existência de embalagens lacradas, produtos com elevado valor agregado, meios de transporte que dificultam o acesso, entre outros. Para estes casos, um método alternativo de amostragem pode ser aplicado, desde que o mesmo seja tão representativo quanto possível e esteja integralmente descrito e documentado (García-Cela et al., 2013).

É importante destacar que, sempre que houver colheita de amostras, o material obtido deve ser mantido em seu estado original. É absolutamente necessário protegê-lo do calor e de qualquer possibilidade de absorção de umidade, fatores que poderiam levar a ocorrência de um resultado falso positivo, em virtude do desenvolvimento de fungos e, conseqüentemente, da produção de micotoxinas nas amostras já colhidas. Em outras

palavras, o péssimo acondicionamento das amostras colhidas poderá gerar resultados analíticos positivos para micotoxinas, sendo que esta, na sua condição original, inicialmente não existia (Fonseca, 2002). Por isso, as amostras devem ser devidamente embaladas, acondicionadas, etiquetadas, identificadas e lacradas antes de serem enviadas ao laboratório. Já a obtenção da amostra analítica é de responsabilidade do laboratório que realizará a análise, que deve armazenar e organizar as amostras que acordo com a data de amostragem, de forma a facilitar a sua localização quando requisitada.

Preparação eficaz da amostra para análise de micotoxinas

As micotoxinas podem estar presentes em uma ampla variedade de produtos alimentícios e materiais biológicos, portanto, a extração e limpeza a partir de uma amostra dependem das propriedades físico-químicas dos produtos ou materiais a serem analisados, bem como das toxinas a serem detectadas (Betina, 1993, Turner et al., 2009).

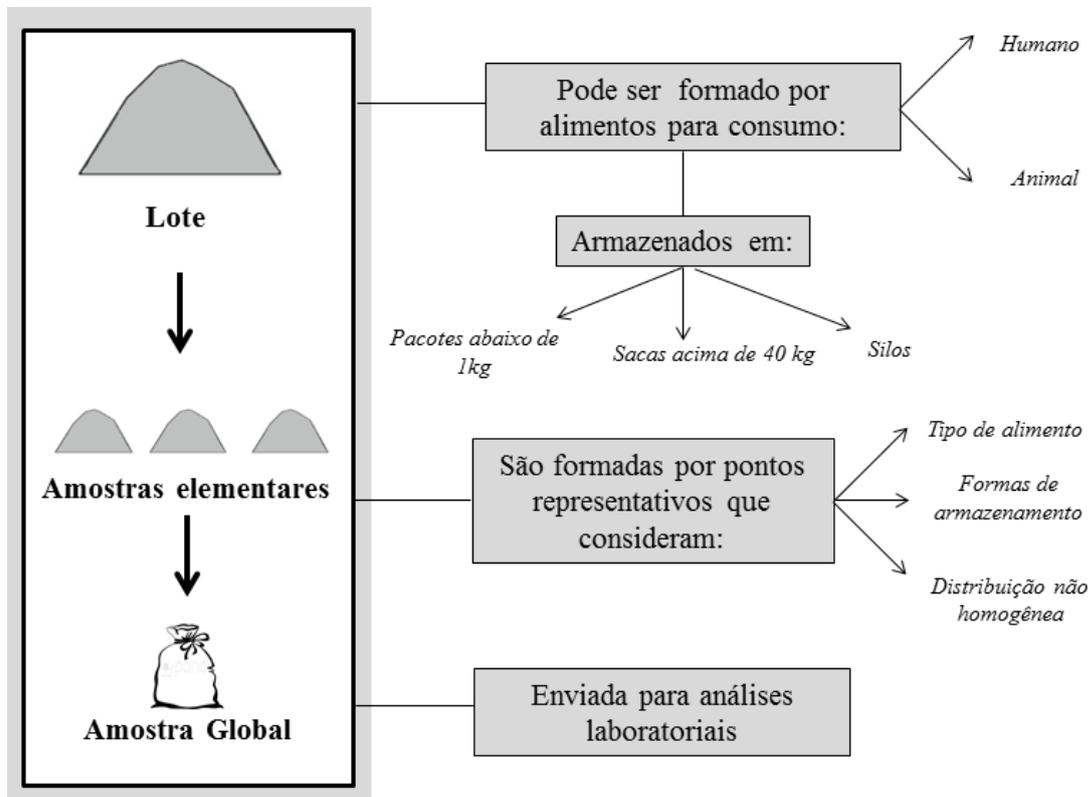


Figura 2. Principais pontos que devem ser levados em consideração para colheita de amostras para análises de micotoxinas.

O processo de extração de micotoxinas de amostras alimentares ou biológicas consiste na separação das micotoxinas da amostra para sua posterior detecção e quantificação. Determinadas matrizes alimentares, considerando as características físico-químicas, podem ser analisadas com maior facilidade, como é o caso do milho, soja e do trigo.

De forma contrária, outros alimentos, de composição mais complexa, como rações, produtos e subprodutos de origem animal, podem tornar o processo de extração mais difícil e oneroso (Ramos et al., 2008). De uma forma geral, as amostras sólidas precisam ser homogeneizadas em sua totalidade, podendo ser moídas a uma granulometria menor e/ou podem ser preparadas até a formação de uma pasta, com o intuito de garantir a homogeneização mais completa possível. Técnicas físicas como agitação mecânica vigorosa são importantes para a extração da micotoxina, uma vez que o tamanho das partículas da amostra é reduzido durante este processo, permitindo uma melhor extração. Isto porque o tamanho da partícula pode afetar na quantidade total de micotoxinas extraídas, bem como na reprodutibilidade dos resultados (Barni, 2001). Além das características físico-químicas descritas acima, o procedimento de extração pode muitas vezes ser complicado, devido a alguns componentes dos alimentos, tais como amido, proteína e gordura (Sharma et al., 2014), bem como por produtos químicos, materiais e solventes utilizados no processo de extração (Valle-Algarra et al., 2014). Por esse motivo, geralmente é empregado neste processo uma grande variedade de misturas de solventes polares e apolares, dependendo da matriz alimentar a ser analisada (Pitt, 2000, Preedy, 2014).

Cabe ressaltar que o procedimento de extração envolve inúmeros passos e, por este motivo, pode sofrer inconvenientes graves, tais como baixa recuperação da micotoxina a ser analisada e contaminação (Wang and Li, 2015). Para solucionar tal problema, é necessária a aplicação de procedimentos de limpeza, os quais visam maior confiabilidade das avaliações analíticas subsequentes (Betina, 1993, Amaral and Machinski Junior, 2006, Serrano et al., 2013). Os procedimentos de purificação (limpeza) do extrato mais comumente utilizados são: extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e coluna de imunoafinidade (IAC) (Figura 3). A extração LLE envolve a exploração da diferente solubilidade das toxinas na fase aquosa e orgânica

não miscível. A aplicação desta técnica objetiva extrair a micotoxina em um solvente, deixando os outros componentes da matriz alimentar ou biológica solúvel no outro solvente utilizado (Turner et al., 2009).

Inicialmente a amostra passa por um processo de agitação juntamente com uma mistura de solventes polares e/ou apolares. Os solventes comumente usados são clorofórmio, acetona, metanol, acetonitrila, benzeno, acetato de etila, hexano e água. Em seguida, agentes precipitantes, como sulfato de cobre e amônia ou terra diatomácea são adicionados a amostra com o intuito de remover os possíveis interferentes como proteínas e pigmentos através do processo de filtração simples. Após este procedimento, o extrato filtrado é adicionado em dois solventes imiscíveis para que as micotoxinas sejam, preferencialmente, particionadas em um dos solventes. Desta forma, é possível realizar a limpeza e transferir as toxinas de um solvente para o outro. Após esta etapa, é necessário concentrar o extrato, já que as micotoxinas podem estar presentes em baixas concentrações no solvente. Esta concentração pode ser realizada em fluxo de nitrogênio e com uso de aquecimento inferior a 50 °C (AOAC, 2005, Scussel, 1998).

A utilização desta técnica, no entanto, apresenta algumas desvantagens, como retenção não específica e gastos provocados pela necessidade de uso de uma grande quantidade de solventes orgânicos, fatos que podem comprometer a recuperação e a sensibilidade para as micotoxinas alvos das análises que serão realizadas (Xie et al., 2015).

Em contraste com a extração LLE, a SPE apresenta maiores benefícios, os quais estão relacionados com um menor tempo de processamento da amostra, menor consumo de solventes e procedimentos mais simples (Poole, 2002). A técnica de SPE consiste na extração da micotoxina pela eluição da amostra em solventes específicos, os quais são adicionados em cartuchos descartáveis constituídos geralmente por sílica gel, C-18 (octadecilsilano) e florisil (Turner et al., 2009).

De modo geral, este procedimento é dividido em quatro etapas. A primeira consiste no condicionamento da coluna SPE com solvente adequado para receber a amostra. Em segundo momento é realizada a introdução da amostra, onde irá ocorrer a retenção do analito na coluna, juntamente com os interferentes da amostra. A

próxima etapa é a limpeza da coluna que serve para remover os interferentes que ficaram retidos na coluna, porém não os analitos. E por fim, a eluição do analito que será concentrado quando necessário e posteriormente quantificado (AOAC, 2005).

Além disso, métodos de SPE são facilmente automatizados e, por este motivo, podem ser

aplicados para a extração de múltiplas micotoxinas (Poole, 2002). No entanto, o desempenho da SPE pode ser afetado pelo pH, solvente e concentração dos íons da amostra, o que por sua vez pode afetar o resultado de detecção e quantificação das análises subsequentes (Valle-Algarra et al., 2014).

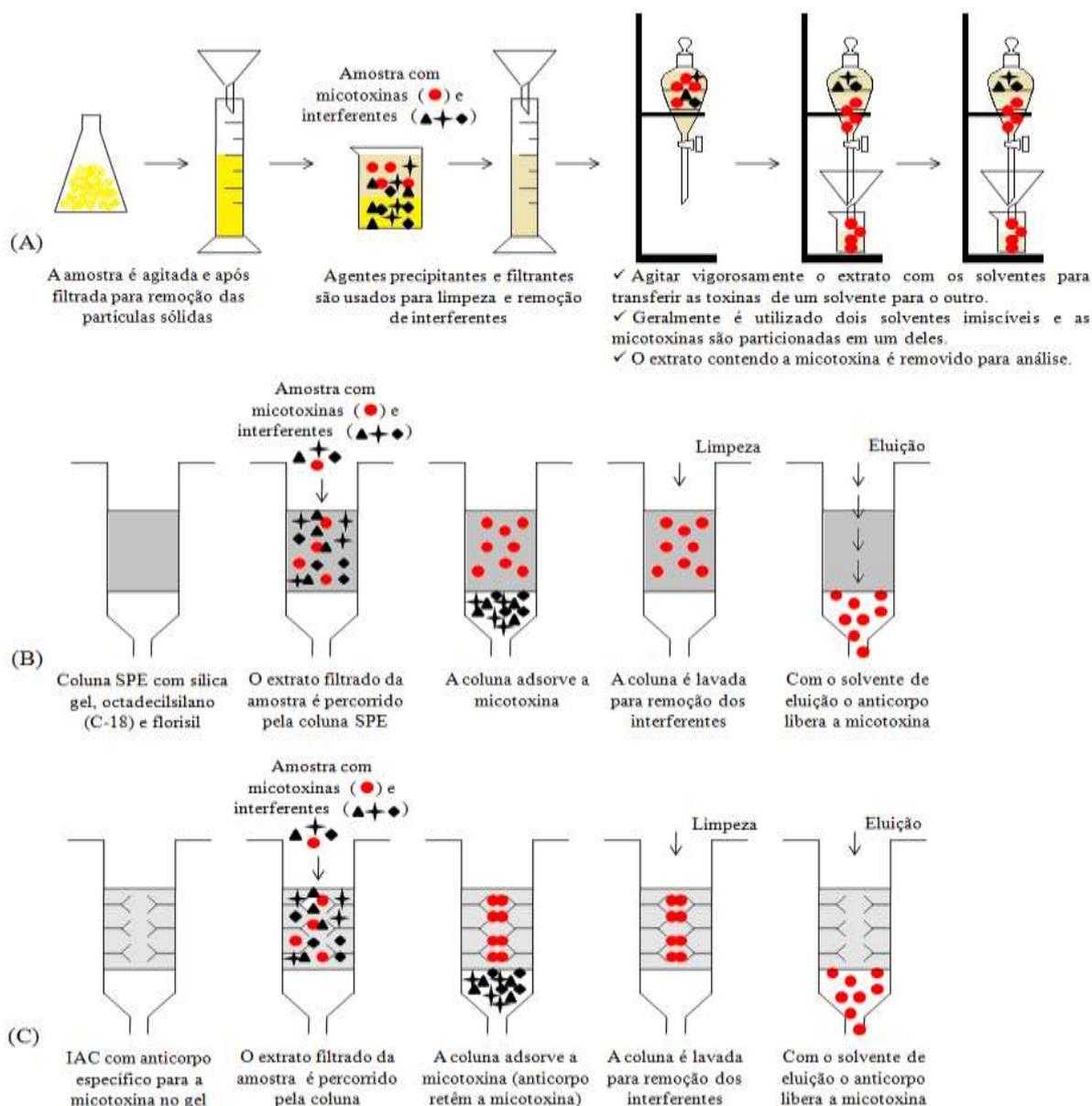


Figura 3. Procedimentos de purificação do extrato da amostra comumente utilizados para análise de micotoxinas em (A) extração líquido-líquido (LLE), (B) extração em fase sólida (SPE) e (C) coluna de imunoafinidade (IAC).

Por outro lado, o uso de IACs tem substituído procedimentos de LLE e SPE para purificação do extrato de amostras alimentares ou biológicas (Scussel et al., 2011). Este processo de purificação das amostras é realizado através da interação de um anticorpo pela(s) micotoxina(s) a ser (em) analisada(s), o que resulta em interferência

mínima nas etapas de quantificação subsequentes (Binder, 2007). O pré-tratamento da amostra é bastante reduzido quando comparado a outras técnicas de extração. O procedimento de extração da micotoxina pela técnica IACs consiste na eluição do extrato da amostra através da coluna, sendo que todos os compostos são lavados e

eluídos, menos as micotoxinas, as quais ficam retidas em anticorpos específicos (Scussel et al., 2011). Após esta reação de antígeno-anticorpo a micotoxina é eluída da coluna e o eluato concentrado e quantificado por técnicas cromatográficas. Isto ocorre devido a um processo de interação imunológico onde as moléculas do analito são fixadas aos anticorpos imobilizados, enquanto os componentes interferentes não ligados ao suporte são eliminados por lavagem da coluna com solventes. Apesar do custo elevado do método (aproximadamente seis vezes superior ao dos métodos físico-químicos), o mesmo apresenta maior rapidez e facilidade de execução (Ramos et al., 2008). Considerando que as colunas podem ser constituídas por diferentes anticorpos, as IACs disponíveis atualmente podem ser aplicadas para mais de uma micotoxina simultaneamente, sendo que para cada micotoxina analisada existe um anticorpo específico (Valle-Algarra et al., 2014). Atualmente, existem disponíveis no mercado IACs para um grande número de micotoxinas, incluindo as AFLs, OTA, FBs, DON e ZON (Vaclavikova et al., 2013, Valle-Algarra et al., 2014). Não há, no entanto, disponibilidade para todos os tipos de micotoxinas existentes, sendo necessário, para estes casos, a aplicação de outros métodos.

Metodologias analíticas para detecção e quantificação de micotoxinas

Métodos de análise são essenciais para determinação do grau de contaminação por micotoxinas, avaliação de exposição ao risco, confirmação do diagnóstico de micotoxicoses, assim como para monitorar e indicar estratégias para diminuição destes agentes tóxicos presentes nos alimentos (Lino et al., 2006, Binder, 2007, Bryden, 2012, Mallmann et al., 2013). Estes métodos de análise devem preferencialmente ser simples, rápidos, sensíveis, seletivos, confiáveis e de baixo custo (Stroka et al., 2004, Amaral and Machinski Junior, 2006, Scussel et al., 2011).

As análises atualmente disponíveis para detecção e quantificação de micotoxinas variam de acordo com o tipo de alimento e também de acordo com o tipo de micotoxina a ser detectada ou quantificada. Uma ampla gama de técnicas estão disponíveis para as análises de micotoxinas (Turner et al., 2009), como por exemplo, a cromatografia de camada delgada (CCD) e ensaios imunoenzimáticos. Além destes métodos, pode-se empregar métodos de cromatografia líquida, os quais representam ferramentas mais recentes e

avanzadas para a determinação e quantificação destas substâncias (Tavčar-Kalcher et al., 2007).

Tradicionalmente, o método mais popular utilizado para análise de micotoxinas é a CCD, o qual oferece grande capacidade de triagem de amostras (Turner et al., 2009). CCD é caracterizada por ser uma metodologia simples, rápida, eficaz e de baixo custo, além de não exigir equipamentos sofisticados (Welke et al., 2009, Preedy, 2014). Este método consiste na adsorção líquido-sólido (Degani et al., 1998), sendo que a separação das micotoxinas se dá pela diferença de afinidade da toxina pela fase estacionária. CCD foi uma técnica de separação extremamente poderosa, rápida e barata em micotoxicologia antes da técnica de HPLC tornar-se mais popular e viável economicamente (Xu et al., 2006). De um modo geral, os extratos das amostras são aplicados por meio de microsseringas em placas cromatográficas normalmente de alumínio recobertas com adsorventes (fase estacionária). Em seguida, as placas são colocadas em câmaras de separação saturadas do solvente (fase móvel) que migra em um sentido ascendente e ultrapassa os pontos onde foram aplicados os extratos na placa, arrastando os seus componentes em velocidades diferentes. Desta forma, é possível distinguir as micotoxinas, uma vez que cada uma irá possuir um fator de retenção (Rf) distinto. O Rf é a razão entre a distância percorrida pela micotoxina e a distância percorrida pela fase móvel. Em seguida, a placa é retirada da câmara e é possível observar por meio de luz ultravioleta, as manchas formadas em decorrência da sua fluorescência natural. Por outro lado, as micotoxinas que não fluorescem naturalmente podem ser visualizadas após aplicação de agentes reveladores e aquecimento das placas cromatográficas (Scussel, 1998).

Diferente da CCD, os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), ou seja, baseados no princípio de antígeno/anticorpo são bastante utilizados. Esta metodologia está relacionada com ensaios competitivos ou não competitivos, onde primeiramente ocorre uma reação entre um anticorpo específico e um antígeno (micotoxina alvo). Em seguida, ocorre a revelação e a mensuração através de uma hidrólise enzimática entre o complexo antígeno-enzima e substrato (Turner et al., 2009, Scussel et al., 2011). O ensaio imunoenzimático representa uma alternativa para a análise qualitativa de micotoxinas, não requerendo nenhum equipamento sofisticado para obtenção dos resultados (Preedy, 2014). Além de

ser de fácil aplicação, as análises realizadas através deste método fornecem respostas rápidas, representando uma alternativa interessante principalmente para o controle de micotoxinas a nível industrial ([Pitt, 2000](#), [Preedy, 2014](#)).

Os métodos cromatográficos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) permitem a detecção e quantificação de substâncias de forma mais precisa e segura. Além disso, o HPLC apresenta alta versatilidade, permitindo o uso de detectores com elevada sensibilidade e especificidade ([Lino et al., 2006](#), [Shephard and De Saeger, 2011](#)). Considerando os fatos acima abordados, a técnica de HPLC tem sido uma das melhores empregadas atualmente para realização de análises de micotoxinas. Basicamente, o método consiste na separação e quantificação das micotoxinas pelas diferentes interações entre a micotoxina, coluna e fase móvel, sendo que esta interação é detectada e quantificada por detectores. Inicialmente a amostra é injetada no cromatógrafo líquido e direcionada em fluxo constante com a fase móvel, até a fase estacionária, onde serão separados os componentes da amostra. A fase móvel deve apresentar capacidade de dissolver a amostra, compatibilidade com o detector e alta pureza. Já a fase estacionária é composta por colunas de adsorção e podem ser de fase reversa ou fase normal, sendo geralmente de inox preenchidas com material adsorvente. Em seguida, são utilizados detectores específicos para cada tipo de micotoxina, sendo que os principais são os de fluorescência, ultravioleta e o de massas. Após a passagem do analito no detector, é possível observar o cromatograma devido ao sinal eletrônico gerado proporcional à quantidade da micotoxina presente na amostra. A validação do método deve ser realizada levando em consideração os parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação, reprodutibilidade, repetibilidade e recuperação.

Para realização da técnica de HPLC, é preciso considerar que, algumas micotoxinas, como por exemplo, as AFLs, apresentam grupos cromóforos, ou seja, grupos que quando expostos a luz ultravioleta emitem fluorescência. Desta forma, as AFLs são facilmente detectadas e quantificadas por estes métodos cromatográficos. Outras substâncias, como por exemplo, as FBs, apresentam uma estrutura caracterizada por grupamentos aminopoliois, os quais não emitem fluorescência. Desta forma, a metodologia para

quantificação das FBs em alimentos precisa ser adaptada. Neste caso, para utilização da técnica de HPLC é preciso primeiramente realizar o processo de derivatização, ou seja, adicionar grupos funcionais capazes de emitir fluorescência, os quais permitirão a detecção desta micotoxina.

A derivatização pode ser realizada através da utilização do ortoftaldeído (OPA). A etapa de derivatização geralmente é aplicada antes da análise de compostos polares em métodos cromatográficos, no entanto, este procedimento consome tempo, além de fornecer uma fonte potencial de erro caso realizado de maneira inadequada ([Berthiller et al., 2007](#)).

No Brasil, as análises oficiais para determinação e quantificação de micotoxinas presentes nos alimentos são realizadas em laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Atualmente, cerca de 18 laboratórios são credenciados no país para realização de análises de resíduos de contaminantes alimentares, incluindo as micotoxinas, sendo que as técnicas de CCD e HPLC são as preferencialmente utilizadas por estes laboratórios para realização de tais procedimentos.

Legislação

À medida que regulamentações mais rígidas são determinadas, é necessário adotar estratégias de monitoramento das micotoxinas nos alimentos, separando os lotes altamente contaminados e garantindo a comercialização de produtos de acordo com as especificações da legislação. O monitoramento e o estabelecimento de limites máximos permitidos quanto a presença de micotoxinas em alimentos auxilia no gerenciamento da real exposição humana e animal a estes contaminantes, sendo ferramentas essenciais para evitar o consumo destas substâncias tóxicas ([Preedy, 2014](#)).

Com o intuito de estabelecer estes limites máximos permitidos, diversas organizações internacionais, tais como a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e *European Standardization Committee* (CEN) estabeleceram valores máximos permitidos de micotoxinas presentes nos diversos tipos de alimentos, assim como estabeleceram métodos de detecção destas substâncias ([Heperkan, 2006](#)).

Tabela 1. Limites máximos toleráveis (LMT) para algumas micotoxinas regulamentadas pela legislação brasileira

Micotoxinas	Alimentos	LMT ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Aplicação (desde 2011)		
Aflatoxinas	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Diversas especiarias	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20	
Deoxinivalenol	Arroz beneficiado e derivados	750
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Fumonisinias	Milho de pipoca	2000
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Zearalenona	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	20
Aplicação (desde 2012)		
Deoxinivalenol	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	2000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, produtos de panificação, cereais e produtos de cereais, exceto trigo e incluindo cevada malteada	1750
Fumonisinias	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	2500
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	2000
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers, produtos de panificação, cereais e produtos de cereais, exceto trigo e incluindo cevada malteada	200
	Arroz beneficiado e derivados	200
	Arroz integral	800
	Farelo de arroz	1000
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	300
	Trigo integral, farinha de trigo integral e farelo de trigo	400
Aplicação (a partir de 2014, prazo limite até 2017)		
Deoxinivalenol	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1500
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	1250
Fumonisinias (B1 + B2)	Milho em grão para posterior processamento	5000
Zearalenona	Milho em grão e trigo para posterior processamento	400
Aplicação (a partir de 2016, prazo limite até 2017)		
Deoxinivalenol	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	750
Fumonisinias	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
	Amido de milho e outros produtos a base de milho	1000
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers, produtos de panificação, cereais e produtos de cereais, exceto trigo e incluindo cevada malteada	100
	Arroz beneficiado e derivados	100
	Arroz integral	400
	Farelo de arroz	600
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e sub-produtos à base de milho	150
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	200

Fonte: ANVISA (2011, 2013).

Seguindo os mesmos princípios acima abordados, cerca de 100 países já desenvolveram limites específicos para a presença de micotoxinas em dietas humanas e animais (Binder, 2007), os quais levaram em consideração para estas regulamentações tanto o tipo de alimento, quanto o tipo de micotoxina.

De forma semelhante aos outros países (União Europeia, EUA, Canadá), o Brasil atualizou, em 2011, sua legislação referente aos limites máximos de micotoxinas presentes nas dietas humanas (ANVISA, 2011). A nova Resolução (RDC N° 07, de 18 de Fevereiro de 2011) desenvolvida pela ANVISA apresentou limites de aplicações imediatas nos anos pares de 2014 e 2016 para diversas micotoxinas (AFLs, OTA, DON, FBs, ZON e Patulina) nos alimentos. No entanto, em dezembro de 2013, uma nova legislação da ANVISA entrou em vigor, prorrogando o prazo limite para as próximas aplicações (2014 e 2016) até 2017 (ANVISA, 2013). Isto para permitir que os novos limites sejam melhor avaliados a partir de análises da maior quantidade de dados disponíveis e que retratem a realidade nacional. Em adição, que sejam suficientes para a proteção da saúde do consumidor com o menor impacto possível na produção. Na Tabela 1 é possível observar que os limites máximos toleráveis especialmente para DON, FBs e ZON nos alimentos serão reduzidos até 2017. Em adição, menores limites são regulamentados para AFLs em leite, especialmente em alimentos para lactantes e crianças de primeira infância, enquanto que, maiores limites para FBs e DON são permitidos em grãos de trigo e milho para posterior processamento. Os diferentes níveis atribuídos se devem principalmente pelo conhecimento das estruturas químicas e sua ação no organismo, bem como da sensibilidade de métodos analíticos que permitem detectá-las nos alimentos. Cabe ressaltar que produtos brasileiros destinados à exportação devem seguir as legislações estipuladas pelo país de destino do produto. Como exemplo, podemos citar o regulamento (CE) n° 1152/2009, publicado pelo Jornal Oficial da União Europeia, o qual regulamenta que 100% das amostras de castanhas do Brasil devem ser analisadas. Os laudos de amostragem e análise, para estes casos, devem ser realizados de acordo com o regulamento (CE) n° 401/ 2006, os quais são analisados por fiscais do MAPA e pelos laboratórios oficiais e/ou credenciados.

Considerações finais

Além de adequar-se aos novos padrões nacionais, o setor do agronegócio precisará, nos próximos anos, avaliar e determinar limites que também contemplem alimentos destinados aos animais, com o intuito de mitigar o risco de contaminação por micotoxinas e o conseqüentemente comprometimento da saúde humana ou animal. Além disso, caberá ao agronegócio ampliar a frequência de colheita e realização de análises laboratoriais corretas, bem como implantar e aprimorar metodologias que visem evitar a contaminação por micotoxinas em produtos destinados a alimentação.

Por fim, para atender às exigências da legislação brasileira para micotoxinas previstas para 2017 e proteger os consumidores da exposição ao risco, vários alimentos deverão ser analisados. Desta forma, o conhecimento de procedimentos para a colheita de amostras e análises laboratoriais, bem como a escolha de métodos rápidos, confiáveis e sensíveis para a quantificação de micotoxinas, são de fundamental importância para a detecção real dos níveis de micotoxinas presentes nos alimentos.

Referências bibliográficas

- Ahlberg, S. H., Joutsjoki, V. & Korhonen, H. J. 2015. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 87-102.
- Amaral, K. A. S. & Machinski Junior, M. 2006. Métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. *Revista Analytica*, 1-3.
- AOAC. 2005. - *Association Official Analytical Chemist (2005)*, Official Methods of Analysis (18th ed.) edn. AOAC, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Armorini, S., Altafini, A., Zaghini, A. & Roncada, P. 2015. Occurrence of aflatoxin B1 in conventional and organic flour in Italy and the role of sampling. *Food Control*, 50, 858-863.
- Barni, A.C. 2001. Incidência de aflatoxinas em alimentos que compõem cesta básica comercializada na cidade de Curitiba/PR. Tese (Mestrado em Tecnologia e Engenharia de Alimentos). Curitiba: UFPR. 78 p.
- Bennett, J. W. & Moore, G. G. 2015. Mycotoxins. *Reference Module in Biomedical Sciences*, 16, 497-516.

- Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R. & Schuhmacher, R. 2007. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 33-37.
- Betina, V. 1993. Sampling, sample preparation, extraction and clean-up. *Journal of Chromatography Library*, 54, 3-11.
- Binder, E. M. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133, 149-166.
- Bryden, W. L. 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 134-158.
- Cabral, L. C., Fernández Pinto, V. & Patriarca, A. 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 1-14.
- Cheli, F., Battaglia, D., Gallo, R. & Dell'Orto, V. 2014. EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. *Food Control*, 37, 315-325.
- Coppock, R. W. & Jacobsen, B. J. 2009. Mycotoxins in animal and human patients. *Toxicology and Industrial Health*, 25, 637-655.
- Degani, A. L. G., Cass, Q. B. & Vieira, P. C. 1998. Cromatografia um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, 7, 21-25.
- Degraeve, S., Madege, R. R., Audenaert, K., Kamala, A., Ortiz, J., Kimanya, M., Tiisekwa, B., De Meulenaer, B. & Haesaert, G. 2016. Impact of local pre-harvest management practices in maize on the occurrence of *Fusarium* species and associated mycotoxins in two agro-ecosystems in Tanzania. *Food Control*, 59, 225-233.
- Flores-Flores, M. E., Lizarraga, E., de Cerain, A. L. & González-Peñas, E. 2015. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control*, 53, 163-176.
- Fonseca, H. 2002. Sampling plan for the analysis of aflatoxin in peanuts and corn: an update. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 97-105.
- García-Cela, E., Ramos, A. J., Sanchis, V. & Marin, S. 2013. Risk management towards food safety objective achievement regarding to mycotoxins in pistachio: the sampling and measurement uncertainty issue. *Food Control*, 31, 392-402.
- Gong, L., Jiang, Y. & Chen, F. 2015. Molecular strategies for detection and quantification of mycotoxin-producing *Fusarium* species: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1767-1776.
- Gutleb, A. C., Caloni, F., Giraud, F., Cortinovis, C., Pizzo, F., Hoffmann, L., Bohn, T. & Pasquali, M. 2015. Detection of multiple mycotoxin occurrences in soy animal feed by traditional mycological identification combined with molecular species identification. *Toxicology Reports*, 2, 275-279.
- Hepkeran, D. 2006. Detecting and controlling mycotoxin contamination of herbs and spices. In: Peter, K. V. (ed.) *Handbook of herbs and spices*. Elsevier.
- Kumar, V., Basu, M. S. & Rajendran, T. P. 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27, 891-905.
- Lino, C. M., Silva, L. J. G. & Pena, A. S. 2006. Metodologias analíticas para determinação das fumonisinas em milho e alimentos à base de milho. *Química Nova*, 29, 293-299.
- Liu, Y. & Wu, F. 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 118, 818-824.
- Maestroni, B., Cannavan, A. & Joint, F. A. O. 2011. Sampling strategies to control mycotoxins. In: Saeger, S. D. (ed.) *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed*. Elsevier.
- Mallmann, A. O., Marchioro, A., Oliveira, M. S., Rauber, R. H., Dilkin, P. & Mallmann, C. A. 2014. Comparison of the efficiency between two sampling plans for aflatoxins analysis in maize. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 35-42.
- Mallmann, A. O., Marchioro, A., Schneider Oliveira, M., Minetto, L., da Silva Wovst, L. R., Hummes Rauber, R., Dilkin, P. & Mallmann, C. A. 2013. Dois planos de amostragem para análise de fumonisinas em milho. *Ciência Rural*, 43.
- Nones, J., Nones, J., Riella, H. G., Kuhnen, N. C. & Trentin, A. 2015. Bentonite protects neural crest stem cells from death caused by aflatoxin B 1. *Applied Clay Science*, 104, 119-127.
- Nones, J., Nones, J. & Scussel, V. M. 2014. Analysis of the presence of mycotoxins in swine feed and its possible effects on semen

- quality in a rural property of Santa Catarina. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 13, 7-13.
- Nones, J., Nones, J. & Trentin, A. G. 2013. Flavonoid hesperidin protects neural crest cells from death caused by aflatoxin B1. *Cell Biology International*, 37, 181-186.
- Nones, J. & Scussel, V. M. 2013. Zearalenone, metabolites and their effects on swine reproductive performance: a review. *PUBVET*, 7, 1-23.
- Oliveira, C. A. F., Corassin, C. H., Corrêa, B., Oswald, I. P. & Van Alfen, N. K. 2014. Animal health: mycotoxins. In: Neal, K. & Alfen, V. (eds.) *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Elsevier.
- Ozay, G., Seyhan, F., Yilmaz, A., Whitaker, T. B., Slate, A. B. & Giesbrecht, F. 2006. Sampling hazelnuts for aflatoxin: uncertainty associated with sampling, sample preparation, and analysis. *Journal of AOAC International*, 89, 1004-1011.
- Peluque, E., Neres, N. B., Michelin, E. C., Reis, T. A., Rosim, R. E., Oliveira, C. A. F., Sousa, R. L. M., Corrêa, B. & Fernandes, A. M. 2014. Fumonisin B1 in cereal mixtures marketed in Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7, 46-48.
- Pereira, V. L., Fernandes, J. O. & Cunha, S. C. 2014. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 36, 96-136.
- Pitt, J. I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56, 184-192.
- Poole, C. F. 2002. Principles and practice of solid-phase extraction. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 37, 341-387.
- Preedy, V. R. 2014. *Coffee in health and disease prevention*. Academic Press.
- Ramos, C. R., Brasil, E. M. & Geraldine, R. M. 2008. Avaliação de métodos de extração, limpeza e purificação de aflatoxinas para análise em cromatografia líquida de alta eficiência. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 38, 103-108.
- Santos, M. C., Sousa, R. B., de Oliveira, S. E. M., Lima, K. S. C. & Lima, A. L. S. 2014. Micotoxinas e seu potencial como agentes de guerra. *Revista Virtual de Química*, 6, 761-778.
- Savi, G. D., Piacentini, K. C., Marchi, D. & Scussel, V. M. 2016a. Fumonisin B1 and B2 in the corn-milling process and corn-based products, and evaluation of estimated daily intake. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33, 339-345.
- Savi, G. D., Piacentini, K. C., Tibola, C. S., Santos, K., Maria, G. S. & Scussel, V. M. 2016b. Deoxynivalenol in the wheat milling process and wheat-based products and daily intake estimates for the Southern Brazilian population. *Food Control*, 62, 231-236.
- Scussel, V. M. 1998. *Micotoxinas em alimentos*. Insular, São Paulo.
- Scussel, V. M., Giordano, B. N., Simao, V., Manfio, D., Galvao, S. & Rodrigues, M. N. F. 2011. Effect of oxygen-reducing atmospheres on the safety of packaged shelled Brazil nuts during storage. *International Journal of Analytical Chemistry*, 1, 1-10.
- Serrano, A. B., Font, G., Mañes, J. & Ferrer, E. 2013. Comparative assessment of three extraction procedures for determination of emerging Fusarium mycotoxins in pasta by LC-MS/MS. *Food Control*, 32, 105-114.
- Shephard, G. S. & De Saeger, S. 2011. Chromatographic separation techniques for determination of mycotoxins in food and feed. In: Saeger, S. (ed.) *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.
- Stroka, J., Spanjer, M., Buechler, S., Barel, S., Kos, G. & Anklam, E. 2004. Novel sampling methods for the analysis of mycotoxins and the combination with spectroscopic methods for the rapid evaluation of deoxynivalenol contamination. *Toxicology Letters*, 153, 99-107.
- Tavčar-Kalcher, G., Vrtač, K., Pestevšek, U. & Vengušt, A. 2007. Validation of the procedure for the determination of aflatoxin B1 in animal liver using immunoaffinity columns and liquid chromatography with postcolumn derivatisation and fluorescence detection. *Food Control*, 18, 333-337.
- Tibola, C. S., Fernandes, J. M. C. & Guarienti, E. M. 2016. Effect of cleaning, sorting and milling processes in wheat mycotoxin content. *Food Control*, 60, 174-179.
- Tibola, C. S., Fernandes, J. M. C., Guarienti, E. M. & Nicolau, M. 2015. Distribution of Fusarium mycotoxins in wheat milling process. *Food Control*, 53, 91-95.

- Tomašević-Čanović, M., Daković, A., Rottinghaus, G., Matijašević, S. & Đuričić, M. 2003. Surfactant modified zeolites—new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous and Mesoporous Materials*, 61, 173-180.
- Turner, N. W., Subrahmanyam, S. & Piletsky, S. A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168-180.
- Vaclavikova, M., MacMahon, S., Zhang, K. & Begley, T. H. 2013. Application of single immunoaffinity clean-up for simultaneous determination of regulated mycotoxins in cereals and nuts. *Talanta*, 117, 345-351.
- Valle-Algarra, F. M., Mateo-Castro, R., Mateo, E. M., Gimeno-Adelantado, J. V. & Jiménez, M. 2014. Mycotoxins: detection and analysis by classical techniques. In: Batt, C. A. (ed.) *Encyclopedia of food microbiology*. Elsevier.
- Wang, X. & Li, P. 2015. Rapid screening of mycotoxins in liquid milk and milk powder by automated size-exclusion SPE-UPLC-MS/MS and quantification of matrix effects over the whole chromatographic run. *Food Chemistry*, 173, 897-904.
- Welke, J. E., Hoeltz, M., Dottori, H. A. & Noll, I. B. 2009. Ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle da patulina em alimentos. *Ciência Rural*, 39, 300-308.
- Whitaker, T. B., Slate, A. B., Jacobs, M., Hurley, J. M., Adams, J. G. & Giesbrecht, F. G. 2006. Sampling almonds for aflatoxin, Part I: Estimation of uncertainty associated with sampling, sample preparation, and analysis. *Journal of AOAC International*, 89, 1027-1034.
- Whitaker, T. B., Trucksess, M. W., Johansson, A. S., Giesbrecht, F. G., Hagler Jr, W. M. & Bowman, D. T. 1997. Variability associated with testing shelled corn for fumonisin. *Journal of AOAC International*, 81, 1162-1168.
- Xie, J., Peng, T., He, J.-L., Shao, Y., Fan, C.-L., Chen, Y., Jiang, W.-X., Chen, M., Wang, Q. & Pei, X.-Y. 2015. Preparation and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of aflatoxin B 1 in 13 kinds of foodstuffs. *Journal of Chromatography B*, 998, 50-56.
- Xu, B.-j., Jia, X.-q., Gu, L.-j. & Sung, C.-k. 2006. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control*, 17, 271-285.
- Zachariasova, M., Dzuman, Z., Veprikova, Z., Hajkova, K., Jiru, M., Vaclavikova, M., Zachariasova, A., Pospichalova, M., Florian, M. & Hajslova, J. 2014. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Animal Feed Science and Technology*, 193, 124-140.
- Zöllner, P. & Mayer-Helm, B. 2006. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1136, 123-169.

Article History:

Received 1 December 2016

Accepted 16 January 2017

Available on line 20 January 2017

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.