

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Zoila Naeko Coloma Adaniya

MICOTOXINAS NO MILHO ROXO PERUANO

Santa Maria, RS
2017

Zoila Naeko Coloma Adaniya

MICOTOXINAS NO MILHO ROXO PERUANO

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

COLOMA ADANIYA, ZOILA NAEKO
MICOTOXINAS NO MILHO ROXO PERUANO / ZOILA NAEKO
COLOMA ADANIYA.- 2017.
53 p.; 30 cm

Orientador: Carlos Augusto Mallmann
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2017

1. Micotoxinas 2. Milho roxo 3. Peru 4. Chicha
morada I. Mallmann, Carlos Augusto II. Título.

Zoila Naeko Coloma Adaniya

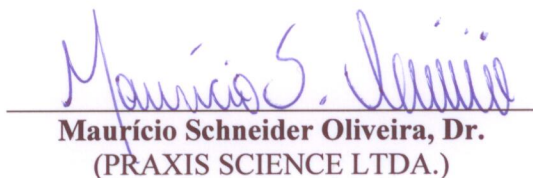
MICOTOXINAS NO MILHO ROXO PERUANO

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 29 de setembro de 2017:


Carlos Augusto Mallmann, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Jaqueline Garda Buffon, Dra. (FURG)


Maurício Schneider Oliveira, Dr.
(PRAXIS SCIENCE LTDA.)

Santa Maria, RS
2017

Dedico este trabalho ao meu amado filho Fabián, aos meus pais Gregorio e Julia (in memoriam) e ao meu irmão Mitsuo (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço a Deus por cada momento de minha vida e cada pessoa no meu caminho.

Aos meus pais Gregório e Julia (*in memoriam*), por me ensinarem que a honestidade, esforço e dedicação são essenciais em nossa vida. Aos meus grandes amores Fabián e Omar, pelo apoio e companhia nesta aventura para tornar meus sonhos realidade. Aos meus irmãos e irmãs, pela confiança em cada um de meus projetos.

Ao Prof. Carlos Augusto Mallmann, que no dia 08 de abril do 2011 permitiu me iniciar o caminho para mudar minha vida profissional e pessoal. Obrigada pela confiança, conselhos, palavras de alento, carinho e apoio.

Ao Prof. Paulo Dilkin e a sua esposa Ania pela sua ajuda, conselhos e amizade para mim e minha família.

Ao Dr. Maurício Schneider Oliveira, muito obrigada pela paciência, guia e ajuda durante minha etapa de mestranda.

Ao meu amigo e colega Adriano Mallmann, você sabe tudo o que tenho que lhe agradecer, infinitamente obrigada.

À Universidade Federal de Santa Maria por me permitir formar parte do seu corpo discente e à CAPES pela bolsa de estudo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela ajuda neste período de minha formação. À secretária Maria Moro da Rosa, muito obrigada por resolver minhas dúvidas.

À todo o pessoal do LAMIC, aos pós-graduandos, bolsistas, residentes e estagiários, pela ajuda em cada etapa de desenvolvimento de meu trabalho de pesquisa, pelos momentos de discussão científica, conversa e descontração. Principalmente ao Dr. Carlos Almeida, Cristiane Rosas e Fabiana Portella, pelo auxílio no desenvolvimento de minha pesquisa.

Ao pessoal da Adisseo e da Pegasus Science, especialmente à Cris, Denize e Francis, obrigada pelos conselhos, risadas e apoio.

À todas as pessoas com as quais compartilhe em algum momento de minha estadia nesta cidade, muito obrigada, com certeza formam parte desta inesquecível história!

RESUMO

MICOTOXINAS NO MILHO ROXO PERUANO

AUTORA: Zoila Naeko Coloma Adaniya

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

O milho roxo é uma variedade de milho que é produzido nos Andes peruanos. Sua cor característica é pela presença do pigmento antiocianina que apresenta propriedades antioxidantes, antimutagênicas, anticancerígenas e antidiabéticas. Estas características fizeram com que além de ser usado como corante, seja utilizado como matéria prima na elaboração de vários subprodutos. Atualmente o Peru exporta este insumo, porém, pela falta de regulamentação e por ser considerado um produto orgânico, não são exigidas análises de micotoxinas. Estas toxinas, podem ser produzidas por fungos filamentosos em qualquer etapa da cadeia alimentícia do milho. O seu consumo por humanos ou animais pode provocar efeitos carcinogênicos, mutagênicos, hepatotóxicos, estrogênicos, imunotóxicos e nefrotóxicos, motivo pelo qual órgãos internacionais determinaram limites máximos toleráveis (LMT) de micotoxinas em alimentos para tentar controlar a exposição. Considerando os possíveis efeitos que as micotoxinas podem ocasionar nos consumidores de milho roxo peruano, objetivou-se determinar a presença de micotoxinas neste milho através da identificação e quantificação por LC-MS/MS. 82 amostras de milho roxo foram obtidas em diferentes mercados do Peru em dois períodos: dezembro de 2015 a março de 2016 e março a abril de 2017. As micotoxinas analisadas foram as aflatoxinas, fumonisinas, zearelenona, ocratoxina A e os seguintes tricotecenos: deoxinivalenol, nivalenol, fusarenona X, deacetoxiscirpenol, 3 acetil-DON, toxina HT-2 e toxina T-2. As micotoxinas com maior frequência foram aflatoxinas e fumonisinas, 64,6 e 63,4%, respectivamente, com co-ocorrência destas duas micotoxinas em 45,1% das amostras. Somente em uma amostra foi quantificado zearelenona (24,4 µg/kg), enquanto que a ausência de ocratoxina A e tricotecenos foi verificado. Considerando os LMT, implementados pela Comunidade Europeia (EC, 2006; 2007; 2013), 12% das amostras analisadas apresentaram concentrações superiores ao LMT de 1000 µg kg⁻¹ para fumonisinas e uma amostra apresentou LMT de 10 µg kg⁻¹ superior para aflatoxinas. No entanto, considerando a legislação brasileira, 9,8% das amostras apresentaram níveis superiores ao LMT de 5000 µg/kg de fumonisinas (BRASIL, 2011; 2013; 2017). Esta é a primeira pesquisa que avalia a ocorrência de micotoxinas no milho roxo peruano e identifica que esse milho pode constituir uma fonte de intoxicação, oferecendo risco à saúde pública. A cadeia produtiva deste grau precisa de controles para determinar os fatores que influenciam na apresentação de micotoxinas e implementar uma legislação com os LMT de micotoxinas neste produto.

Palavras-chave: Chicha morada. Mazamorra morada. Aflatoxinas. Fumonisin. *Zea mays*.

ABSTRACT

MYCOTOXINS IN PERUVIAN PURPLE MAIZE

AUTHOR: Zoila Naeko Coloma Adaniya

ADVISER: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Purple corn is a variety of corn that is produced in the Peruvian Andes. Its characteristic color is by the presence of the pigment called antiocyanine that presents antioxidant, antimutagenic, anticancer and anti-diabetic properties. These characteristics have made that in addition to being used as a dye, is used as raw material in the elaboration of several by-products. Currently Peru exports this input, however, due to the lack of regulation and because it is considered an organic product, mycotoxin analyzes are not required. These toxins can be produced by filamentous fungi at any stage of the maize food chain. Its consumption by humans or animals can cause carcinogenic, mutagenic, hepatotoxic, estrogenic, immunotoxic and nephrotoxic effects, which is why international organisms have established maximum tolerable limits (MTL) of mycotoxins in foods to try to control exposure. Considering the possible effects of mycotoxins on consumers of Peruvian purple maize, the objective was to determine the presence of mycotoxins in this corn through LC-MS/MS. A total of 82 samples of purple maize were obtained from different Peruvian markets in two periods: December 2015 to March 2016 and March to April 2017. The mycotoxins analyzed were aflatoxins, fumonisins, zearelenone, ochratoxin A and the following trichothecenes: deoxynivalenol, nivalenol, fusarenone X, deacetoxyscirpenol, 3-acetyl-DON, HT-2 and T-2. It was verified that the most prevalent mycotoxins were aflatoxins and fumonisins, with a prevalence of 64.6 and 63.4%, respectively, with co-occurrence of these two mycotoxins in 45.1% of the samples. Only one sample had a quantifiable concentration for zearelenone and any sample was contaminated by ochratoxin A and trichothecenes. Considering the MTLs implemented by the European Community (EC, 2006, 2007, 2013), 12% of the analyzed samples had concentrations higher than the MTL of 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for fumonisins and one sample had MTL of 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ higher for aflatoxins. However, considering the Brazilian legislation, 9.8% of the samples had levels above the MTL of 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of fumonisins (BRASIL, 2011, 2013, 2017). This is the first research that evaluates the occurrence of mycotoxins analyzed by LC-MS/MS in Peruvian purple maize and identifies that maize may constitute a source of intoxication, posing a risk to public health. Controls are required in the production chain of this grain and the implementation of legislation with MTLs of mycotoxins.

Keywords: Chicha morada. Mazamorra morada. Aflatoxins. Fumonisins. *Zea mays*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Bebida refrescante “chicha morada” e sobremesa “mazamorra morada” elaboradas com o milho roxo no Peru.	15
Figura 2- Subprodutos elaborados com o milho roxo peruano: extrato, comprimidos e suco	15

LISTA DE TABELAS

APRESENTAÇÃO

Tabela 1- Países de destino das exportações do milho roxo peruano em toneladas durante os anos de 2012 a 2016.	16
Tabela 2- Limites máximos toleráveis (LMT) de micotoxinas em milho estabelecidos pela Comunidade Europeia (EC), recomendados pela Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA), Serviço Nacional de Sanidade Agrícola do Peru (SENASA) e Mercado Comum do Sul (MERCOSUL).	21

ARTIGO

Tabela 1- Contaminação média, prevalência ($\% \geq \text{LOQ}^*$), média das amostras positivas e contaminação máxima em amostras de milho roxo peruano.	43
Tabela 2- Contaminação média, percentual de amostras positivas ($\% \geq \text{LOQ}$), média das amostras positivas e valor máximo de micotoxinas em amostras de milho roxo peruano	44
Tabela 3- Limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD) e porcentagens de recuperação dos métodos empregado nas análises de micotoxinas no milho roxo peruano..	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFs	Soma das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	Atmospheric Pressure Ionization
CE	Capillary Electrophoresis
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DON	Deoxinivalenol
EC	European Commission
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ESI	Electrospray Ionization
EUA	Estados Unidos de América
FAO	Food and Agriculture Organization
FBs	Soma das fumonisinas B ₁ e B ₂
FB ₁	Fumonisin B ₁
FB ₂	Fumonisin B ₂
GC	Gas Chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	International Organization for Standardization
kg	Quilogramas
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
LC	Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
LMT	Limite Máximo Tolerável
LOQ	Limit of Quantification
m/z	Relação massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MS	Massa
NIR	Near Infrared Spectroscopy
OMS	World Health Organization
OTA	Ocratoxina A
pH	Potencial Hidrogeniônico
SIICEX	Sistema Integrado de Información sobre Comércio Exterior de Peru
SUNAT	Superintendencia Nacional de Administración Tributaria.
T-2	Toxina T-2
TRICO	Tricotecenos
UFSC	Universidade Federal de Santa Maria
µg	Microgramas
v/v	Volume por volume
ZEA	Zearalenona

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1.	MILHO ROXO PERUANO.....	14
2.2.	MICOTOXINAS.....	16
2.2.1.	Aflatoxinas.....	17
2.2.2.	Ocratoxina A	18
2.2.3.	Fumonisinhas.....	18
2.2.4.	Zearalenona.....	19
2.2.5.	Tricotecenos.....	20
2.3.	NORMATIVAS SOBRE OS LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS (LMT) DE MICOTOXINAS EM MILHO.....	21
3.	ARTIGO	23
4.	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade o milho roxo foi considerado sagrado pelas culturas pré-colombianas do Peru e México. No Peru era conhecido como “Sara” ou “Kulli Sara”, que em língua aymara quer dizer “caminho roxo”. Este milho é constituído por sabugo (15%) e grãos (85%). Segundo Arroyo (2007) o milho roxo peruano apresenta dentro de sua composição química essências, ácido salicílico, resinas, saponinas, sais de potássio e sódio, enxofre, fósforo e compostos fenólicos. A principal antocianina (flavonoide) contida nesse milho é a cianidina 3-glucosídeo. Esta antocianina é utilizada como um corante natural, além de ter propriedades antioxidantes (HARAKOTR et al., 2014, PEDRESCHI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2006), anticancerígenas (KAMEI et al., 1995; FUKAMACHI et al., 2008; HAGIWARA et al., 2001), antimutagênicas (PEDRESCHI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2006) e antidiabéticas (TSUDA et al., 2003; THIRAPHATTHANAVONG et al., 2014). No Peru, este milho é utilizado como corante e na gastronomia, principalmente em forma de uma bebida refrescante e uma sobremesa chamadas de *chicha morada* e *mazamorra morada*, respectivamente, que são consumidas por pessoas de todas as idades e níveis socioeconômicos (RAMOS-ESCUDEIRO et al., 2012). O milho roxo é considerado um produto orgânico e para sua comercialização necessita de certificações que garantam sua produção orgânica (ANDERSEN, 2003), mas que não considera a contaminação por micotoxinas.

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, que contaminam grãos de cereais. De todos os metabólitos, os de maior importância econômica e na saúde pública são as aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), fumonisinas (FBs), deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA) e toxina T-2 (T-2). Estas toxinas podem ser cancerígenas (BUTLER, GREENBLATT e LIJINSKY, 1969; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993), mutagênicas (KUCZUK et al., 1978), hepatotóxicas (BUTLER, GREENBLATT e LIJINSKY, 1969), nefrotóxicas (KROGH et al., 1977) e citotóxicas que muitas vezes causam micotoxicoses, que desencadeiam imunossupressão e alterações endócrinas (ABIA, 2013; MALLMANN e DILKIN, 2007).

Os métodos atuais para a quantificação das micotoxinas em baixas concentrações e controle de qualidade de alimentos dependem da cromatografia líquida de alta eficiência (LC ou CLAE) acoplada à um detector ultravioleta ou de fluorescência e a detecção por espectrometria de massa sequencial (MS), utilizando ionização de pressão atmosférica (API) ou interfaces de ionização por electrospray (ESI) devido a sua fácil manipulação, alta sensibilidade e precisão (BOUTSIADOU-THEURILLAT, MEIER e RICHARD, 2014;

KOPPEN et al., 2010; RAHMANI, JINAP e SOLEIMANY, 2009). A cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) é considerada desde o ano 2002 como o método de confirmação adequado para a identificação de micotoxinas (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Considerando que as micotoxinas são um risco para a saúde pública, foi desenvolvido o presente estudo com o objetivo de determinar a presença de micotoxinas no milho roxo peruano por LC-MS/MS e comparar a contaminação com os limites máximos toleráveis (LMTs) de micotoxinas recomendados pela Food and Drugs Administration (FDA), regulamentados na Comunidade Europeia e no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MILHO ROXO PERUANO

O milho roxo atualmente é cultivado no Peru, Bolívia, Chile, Equador e México. Porém, devido às características geográficas do Peru, seu cultivo é mais extenso nesse país (GUILLÉN-SÁNCHEZ, MORI-ARISMENDI e PAUCAR-MENACHO, 2014). O Peru apresenta cinco tipos naturais de milho roxo: Cuzco, Canta, roxo de Caraz, Arequipa e preto de Junín e duas variedades melhoradas denominadas PNV-581 e PNV-582 (INSTITUTO NACIONAL DE DEFENSA DE LA COMPETENCIA Y DE LA PROTECCIÓN DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL, 2016). Além disso, tem-se as variedades INIA 615 e INIA 601 que se adaptam de forma diferente aos climas da costa e das montanhas peruanas. As condições ideais para sua produção são solos profundos argilosos que retém a umidade com um pH entre 5 e 8; altitudes entre 1000 e 2900 metros sobre o nível do mar e temperaturas entre 18 e 23 °C (SOLID PERU, 2010).

Segundo Arroyo et al. (2007), o milho roxo peruano apresenta a cianidina 3-glucosídeo, que é uma antocianina (flavonoide) utilizada como um corante natural, que tem demonstrado propriedades antioxidantes (HARAKOTR et al., 2014, PEDRESCHI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2006), contribui na redução da obesidade, melhora da hiperglicemia (TSUDA et al., 2003), apresenta propriedades anticancerígenas (KAMEI et al., 1995; FUKAMACHI et al., 2008; HAGIWARA et al., 2001) e antimutagênicas (PEDRESCHI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2006; THIRAPHATTHANAVONG et al., 2014).

A principal utilização do milho roxo no Peru é na gastronomia, para a elaboração de uma bebida refrescante e uma sobremesa chamada de *chicha morada* e *mazamorra morada*, respectivamente (PEDRESCHI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; RAMOS-ESCUADERO, et al., 2012) (Figura 1). O consumo destes subprodutos é realizado por pessoas de todas as idades e níveis socioeconômicos. Além disso, pelas suas comprovadas propriedades benéficas para a saúde, houve o desenvolvimento de outros tipos de subprodutos: extrato, concentrado, suco, farinha, cápsulas entre outros (Figura 2).

Desde o ano de 1993 o milho roxo é exportado para os Estados Unidos, União Europeia e Japão (AGRODATA PERU, 2017). Atualmente, de acordo com o Sistema Integrado de Información de Comércio Exterior de Peru (SIICEX, 2016), os principais destinos da exportação do milho roxo são os Estados Unidos, Equador, Chile, Espanha e Japão (Tabela 1).

Figura 1 – Bebida refrescante “*chicha morada*” e sobremesa “*mazamorra morada*” elaboradas com o milho roxo no Peru.



Fontes:

“*Chicha morada*”: https://3.bp.blogspot.com/-xKKlm0Dxo4Y/Vvqh05LvYvI/AAAAAAAAAU0c/D8MdbuwnVUsJUzcIBMQQxCXRcsecaSVw/s640/2ed8a2_09cf6de2f33a420eb9ff76d3d642ff9c.png

“*Mazamorra morada*”: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTSiqMZZwo35UTs8jYo7YyJXLZ3vjt4uYN8au_2iRqrfqedoJmvKg

Figura 2- Subprodutos elaborados com o milho roxo peruano: extrato, comprimidos e suco



Fontes:

Extrato: http://www.boutique-peruvienne.com/2089-home_default/maiz-morado-en-polvo-ecoandino-250g.jpg

Comprimidos: <http://csimg.mercamania.es/srv/ES/000037564489/T/340x340/C/FFFFFF/url/purple-corn-maa-z-morado-550.jpg>

Suco: <http://vivanda.vteximg.com.br/arquivos/ids/165517-1000-1000/20050336.jpg>

Tabela 1- Países de destino das exportações do milho roxo peruano em toneladas durante os anos de 2012 a 2016.

País/Ano	2012	2013	2014	2015	2016
Estados Unidos	302	350	317	394	373
Equador	86	53	2	294	156
Chile	58	71	81	127	159
Espanha	45	49	41	53	51
Japão	32	45	12	28	25
Cingapura	18	39	22	25	24
Países Baixos (Holanda)	6	8	2	9	20
Itália	7	17	38	9	12
Canadá	3	6	17	7	10
Costa Rica	7	7	6	6	8
França	2	4	4	4	4
Reino Unido	0	2	2	3	4
Total	567	652	542	958	845

Fonte: SUPERINTENDENCIA NACIONAL DE ADMINISTRACIÓN TRIBUTARIA (SUNAT), 2016 apud SISTEMA INTEGRADO DE INFORMACIÓN DE COMÉRCIO EXTERIOR DE PERU (SIICEX), 2016.

2.2. MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabolitos tóxicos produzidos por fungos filamentosos como parte de seu metabolismo secundário e contaminam produtos agroalimentares por todo o mundo. Os fungos mais encontrados são dos gêneros *Aspergillus spp.* (produtores de aflatoxinas), *Penicillium spp.* e o *Aspergillus ochraceus* (produtores de ocratoxinas) e *Fusarium spp* (produtores de deoxinivalenol, toxina T-2, zearelenona, ergotoxinas e fumonisinas) (ABRUNHOSA et al., 2012), podem ser encontrados nas matérias-primas utilizadas na elaboração de alimento para animais, como milho, trigo, sorgo e soja (ABRUNHOSA et al., 2012; NJOBEH et al., 2012; KIM et al., 2014). A contaminação por micotoxinas pode ocorrer em qualquer parte da cadeia alimentar, desde a colheita, transporte, processamento e armazenamento (ABRUNHOSA et al., 2012; NJOBEH et al., 2012; MILIĆEVIĆ et al., 2010). De todos os metabólitos, os de maior importância econômica e na saúde pública são as AFs, OTA, FBs, DON, ZEA e toxina T-2. A exposição às micotoxinas em humanos e animais podem ocorrer através da ingestão de insumos e alimentos contaminados, inalação e contato com a pele, ocasionando efeitos biológicos como intoxicação aguda, carcinogenicidade (BUTLER,

GREENBLATT e LIJINSKY, 1969; RHEEDER, 1992; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012), teratogenicidade, mutagenicidade (KUCZUK et al., 1978), efeitos alucinógenos, eméticos (BARGER, 1931 apud VAN DONGEN e DE GROOT, 1995), estrogênicos (CHANG, KURTZ e MIROCHA, 1979), hepatotóxicos (ALPERT et al., 1971), nefrotóxicos e citotóxicos (KROGH et al., 1977), muitas vezes desencadeando imunossupressão e alterações endócrinas (ABIA, 2013; JAYKUS et al., 2008; MALLMANN e DILKIN, 2007). Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 25% dos alimentos a nível mundial estão contaminados com alguma micotoxina (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2017; SMITH et al., 2016). A co-ocorrência das micotoxinas se reporta a nível mundial nas últimas décadas devido a capacidade dos fungos de produção simultânea de várias micotoxinas e, conseqüentemente, aumentar o risco da co-exposição a estas toxinas e seu impacto na saúde humana e animal pelos possíveis efeitos sinérgicos (ASSUNÇÃO, SILVA e ALVITO, 2016; KIM et al., 2014; YIBADATIHAN, JINAP e MAHYUDIN, 2014).

2.2.1. Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos secundários, produzidos por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*. Atualmente são conhecidos 17 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂ (HUONG et al., 2016; OLIVEIRA e GERMANO, 1997). A descoberta das aflatoxinas ocorreu em 1960 na Inglaterra, devido ao surto que provocou alta mortalidade em perus, conhecido como “*Turkey X disease*”. Durante a epidemia, milhares de aves morreram após o consumo de torta de amendoim acrescentada na ração, proveniente do Brasil (BLOUT, 1961). O principal fungo encontrado no alimento foi o *Aspergillus flavus* (DE MELLO e MACDONALD, 1997). As aflatoxinas se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios como: amendoim, milho, feijão, arroz, trigo, entre outros, principalmente em condições de armazenamento impróprias (PEREIRA et al., 2002; KLICH, 2007).

As aflatoxinas são compostos muito tóxicos e considera-se que a sua presença na dieta é o maior fator de risco para o desenvolvimento de câncer hepático, sendo a AFB₁ a mais danosa. Baseado em várias pesquisas com evidências suficientes de que as AFs são cancerígenas em humanos, a International Agency for Research on Cancer (IARC), classificou-a como cancerígeno do grupo I (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON

CANCER, 2012). O metabolismo das aflatoxinas, principalmente a bioativação enzimática da AFB₁, ocorre no fígado através do citocromo P450, formando-se os metabólitos microsossomais AFB₁-8,9-epóxido, AFQ₁ e AFM₁ (MOROE e EATON, 1989).

Estas toxinas além de serem carcinogênicas, produzem danos na morfologia e estrutura funcional das células hepáticas (alterando o DNA dos hepatócitos) e outros órgãos parenquimatosos. Nos seres humanos, a aflatoxicose aguda é caracterizada por vômitos, dor abdominal, edema pulmonar e cerebral, coma, convulsões e até mesmo a morte (MWANDA, OTIENO e OMONGE, 2005).

2.2.2. Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) foi isolada e caracterizada quimicamente no ano 1965. Foi descoberta na África do Sul como um metabólito tóxico produzido pelo *Aspergillus ochraceus* em milho inoculado experimentalmente com este fungo. Em 1972, essa micotoxina foi associada com a Nefropatia Endêmica dos Balcãs, uma disfunção renal degenerativa que atingiu indivíduos adultos da população rural da região dos Balcãs, nos meados de 1950. A OTA ocorre em muitos commodities como grãos de café, feijão, cevada e trigo (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993).

A degradação metabólica da OTA é feita no fígado, rins e intestinos; sendo a maior rota de excreção a urina. Os metabólitos produzidos variam no homem e nas diferentes espécies animais (SUZUKI, SATOH e YAMAZAKI, 1977; HOHLER et al., 1999; MALIR et al., 2016).

Pesquisas demonstraram que a OTA é nefrotóxica (KROGH et al., 1977), hepatotóxica (KANISAWA e SUZUKI, 1978), embriotóxica, teratogênica (MOREÉ et al., 1974), neurotóxica (BRUININK, RASONYI e SIDLER, 1998), imunotóxica (ÁLVAREZ et al., 2004) e cancerígena (KANISAWA e SUZUKI, 1978) em várias espécies. Os danos e o efeito letal podem variar de acordo com o tipo de animal e a quantidade ingerida (IAMANAKA et al., 2010; MALIR et al., 2016). A IARC, no ano 1993, classificou a OTA no grupo 2B como possível cancerígeno em humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993).

2.2.3. Fumonisin

As fumonisin constituem um grupo de micotoxinas descobertas em 1988, com produção constatada por *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. nygamai*,

F. anthophilum e *F. Napiniforme*, sendo os *F. verticillioides* e *F. proliferatum* considerados os principais produtores (FIGUEIRA et al., 2003).

Existem 28 metabólitos relacionados e conhecidos como fumonisinas, estas toxinas estão distribuídas mundialmente e se classificam em quatro grupos A, B, C e P. Porém, as de maior ocorrência natural são as do grupo B (B_1 , B_2 e B_3), produzidas pela maioria das cepas de *Fusarium verticillioides* (DESHMUKH et al., 2016). A fumonisina B_1 (FB_1) constitui mais de 75% do total das fumonisinas, sendo a fumonisina mais tóxica e podendo ser encontrada principalmente no milho na pré-colheita ou no início do armazenamento (DE LA TORRE-HERNÁNDEZ et al., 2014, FERNANDES et al., 2015).

As fumonisinas são inibidores da biossíntese da esfingosina e esfingolípídios complexos e alteram a relação esfinganina:esfingosina (SA:SO) (EUROPEAN COMMISSION, 2000). A fumonisina B_1 , está relacionada com a ocorrência de leucoencefalomalácia em cavalos e edema pulmonar em suínos (MALLMANN e DILKIN, 2007). Além disso, está relacionada com alterações da resposta imune produzindo diminuição da viabilidade dos linfócitos em aves (DOMBRINK-KURTZMAN, et al., 1993), e imunossupressão em suínos (YAZAR e OMURTAG, 2008). Também foi relacionada com a incidência elevada de câncer de esôfago em humanos no Sul da África e China (SEEFELDER, et al., 2002), sendo classificada no grupo 2B da IARC como um possível cancerígeno em humanos (ARIÑO, 2010; LINO et al., 2004; YAZAR e OMURTAG, 2008; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2002).

2.2.4. Zearalenona

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina estrogênica não esteroide produzida por fungos do gênero *Fusarium*, principalmente *F. graminearum*, apresenta baixa toxicidade aguda e embora sua toxicidade em humanos seja pouca entendida, dados obtidos em pesquisas com animais sugerem que sua biotransformação ocorre no tecido hepático e intestinal, produzindo-se a formação de cinco metabólitos, sendo os dois principais α -zearalenol e β -zearalenol. A atividade estrogênica do α -zearalenol é maior do que a zearalenona e β -zearalenol; sendo que o seu metabolismo nas diferentes espécies animais influencia no grau do efeito estrogênico frente a uma exposição desta toxina (BELHASSEN et al., 2015; FLECK et al., 2017).

A ZEA ocorre praticamente em todos os cereais, especialmente em culturas de inverno, como aveia, cevada, trigo, centeio e milho, contaminadas por fungos do gênero *Fusarium* (DILKIN, 2002; IAMANAKA et al., 2010).

Desordens na fertilidade e reprodução em mamíferos são causados pela ingestão de ZEA, sendo os suínos a espécie mais susceptível. A ZEA se acopla aos receptores do 17- β -estradiol, atuando como um desruptor endócrino produzindo hiperestrogenismo. Além disso, pode induzir hepatotoxicidade, morte celular, inibição da síntese de proteína e DNA, imunotoxicidade e redução de ganho de peso. Em humanos a ingestão de ZEA, tem sido associada à apresentação de puberdade precoce em meninas e ao aumento do tamanho dos órgãos reprodutores em crianças. A ZEA pertence ao grupo 3B da IARC por não ter indícios suficientes para considerá-la carcinogênica em humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993; BINDER et al., 2017; GAO et al., 2013; HUEZA et al., 2014).

2.2.5. Tricotecenos

Os tricotecenos são micotoxinas que podem ou não ter um ester macrocíclico, o que diferencia-os em macrocíclicos e não macrocíclicos. Os tricotecenos não macrocíclicos constituem dois grupos: grupo A (T-2, HT-2 e diacetoxiscirpenol) que são relacionados com imunotoxicidade e citotoxicidade e grupo B (deoxinivalenol, 3-acetil-DON e 15-acetil-DON, nivalenol e fusarenona-X), relacionadas com desordens gastrointestinais (PINTON e OSWALD, 2014). Segundo Marin et al. (2013), a toxina T-2 é metabolizada *in vivo* para HT-2, pelo que a toxicidade delas estão muito relacionadas. Um dos mais importantes tricotecenos é o deoxinivalenol (DON), produzido por fungos do gênero *Fusarium*, como *F. graminearum* e *F. culmorum* e frequentemente detectado no milho, trigo e cevada (IAMANAKA et al., 2010). O consumo de alimentos contaminados com DON foi associado a uma série de efeitos adversos em animais, incluindo a recusa de alimentação, vômitos, diarreia, tontura e febre. A exposição crônica ao DON pode levar à redução do crescimento, disfunção imunológica e neurológica. Os efeitos agudos do DON nos seres humanos são parecidos àqueles observados em animais, embora os efeitos ao longo prazo em humanos não tenham sido estabelecidos até agora. O efeito tóxico primário do DON é a inibição da síntese de proteínas, produção de estresse nas células e indução do apoptose. Além disso, incluem alterações das funções neuroendócrinas, comprometimento da integridade intestinal e da função imunológica (ALI et al., 2015). A IARC classificou os tricotecenos (DON, nivalenol, fusarenona X, toxina HT-2 e toxina T-2) no grupo 3B por não haver indícios suficientes como carcinogênico em humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993).

2.3. NORMATIVAS SOBRE OS LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS (LMT) DE MICOTOXINAS EM MILHO

A toxicidade das micotoxinas foi avaliada por organismos internacionais e com base nos resultados destas avaliações foram determinados limites toleráveis de contaminação por micotoxinas em alimentos para tentar controlar a exposição humana (ABIA et al., 2013; PITT, TANIWAKI, e COLE, 2013). Os países da Comunidade Europeia (EC) têm uma legislação específica e detalhada dos limites máximos toleráveis (LMT) para micotoxinas (EUROPEAN COMMISSION, 2006; 2007; 2013) em alimentos. Nos Estados Unidos a Food and Drug Administration orienta sobre os níveis de ação de algumas micotoxinas (FDA, 2000; 2001; 2010). Na América do Sul estes limites estão considerados no acordo do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL, 2002), que agrupa 12 países da região. O Brasil é o país do MERCOSUL com legislação própria que inclui maior quantidade de micotoxinas e categorias alimentares, estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2011; 2013; 2017). Não há legislação específica disponível na literatura com LMT de micotoxinas em milho roxo. Os LMT para as micotoxinas no milho, determinados pela EC, FDA, ANVISA, SENASA e MERCOSUL estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2- Limites máximos toleráveis (LMT) de micotoxinas em milho estabelecidos pela Comunidade Europeia (EC), recomendados pela Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA), Serviço Nacional de Sanidade Agrícola do Peru (SENASA) e Mercado Comum do Sul (MERCOSUL).

Micotoxina	EC ^a	FDA ^b	ANVISA ^c	SENASA ^d	MERCOSUL ^e
	LMT ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				
AFs ^f	10	20	20	*	20
FBs ^g	1000	4000	5000	*	*
ZEA ^h	100	350	40	*	*
DON ⁱ	1750	1000	3000	*	*
OTA ^j	5	*	20	*	*
TRCs ^k	100	*	*	*	*

^aCommission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006; Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007; Commission Recommendation of 27 March 2013 (2013/165/EU). ^bFDA, (U.S. Food and Drug Administration). Guidance for industry: Fumonisin levels in human foods and animal feeds; final guidance (June 6, 2000; revised November 9, 2001); Guidance for industry and FDA: Advisory levels for deoxynivalenol (DON) in finished wheat products for human consumption and grains and grain by-products used for animal feed (June 29,

2010; Revised July 7, 2010); Guidance for industry: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed-Aflatoxin. ^cBrasil. Resolution - RDC No. 7/2011; RDC No. 59/2013; RDC No. 138/2017. ^dPeru. Resolution – RD No 0056-2014-MINAGRI-SENASA-DIAIA of 25 August 2014. ^eMercado Comum do Sul MERCOSUL/GMC/RES. N° 25/02. ^fAFs: aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂), ^gFBs: fumonisinas (B₁+B₂), ^hZEA: zearalenona, ⁱDON: deoxinivalenol, ^jOTA: ocratoxina A, ^kTRICO: nivalenol+fusarenona X+deacetoxiscirpenol+3 acetyl-DON+HT-2+T-2. *LMT não estabelecido.

3. ARTIGO

OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS NO MILHO ROXO PERUANO

Zoila N. Coloma A., Maurício S. Oliveira, Paulo Dilkin, Adriano O. Mallmann, Carlos A.A. Almeida, Carlos A. Mallmann

(Artigo a ser submetido à revista Food Control)

Ocorrência de micotoxinas no milho roxo peruano

Zoila N. Coloma A.^a, Maurício S. Oliveira^a, Paulo Dilkina, Adriano O. Mallmann^a, Carlos A. A. Almeida, Carlos A. Mallmann^{a*}

^a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

* Autor para correspondência. Tel.: +55 55 3220 8445

E-mail address: mallmann@lamic.ufsm.br (Carlos A. Mallmann)

Resumo

Determinou-se a presença de micotoxinas por LC-MS/MS em 82 amostras de milho roxo peruano coletadas em estabelecimentos de comércio local do Peru nos meses de dezembro de 2015 a março de 2016 e março a abril de 2017. Foi avaliado o efeito matriz para cada um dos métodos utilizados, evidenciando a resposta negativa para este parâmetro. As micotoxinas prevalentes foram aflatoxinas (64,6%) e fumonisinas (63,4 %), com médias de 2,1 µg/kg (1-17 µg/kg) e 2586 µg/kg (125-27490 µg/kg), respectivamente. Zearalenona foi identificada em uma amostra na concentração de 24,4 µg/kg. A co-ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas foi em 45,1% das amostras e a co-ocorrência de aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona foi em uma amostra. Foi constatada a ausência de ocratoxina A e dos tricotecenos deoxinivalenol, nivalenol, fusarenona X, diacetoxiscirpenol, 3 acetil-DON, toxina HT-2 e toxina T-2. As amostras apresentaram atividade de água (Aw) acima de 0,73, e não houve correlação com os níveis de micotoxinas encontrados. Esta é a primeira pesquisa que avalia a ocorrência de

micotoxinas analisadas no milho roxo peruano e identifica que esse milho pode constituir uma fonte de intoxicação, oferecendo risco à saúde pública. São necessários controles na cadeia produtiva deste grão para a determinação dos fatores envolvidos na apresentação destas toxinas e a implementação de legislação com limites máximos toleráveis de micotoxinas.

Keywords: chicha morada, mazamorra morada, aflatoxins, fumonisins, *Zea mays*

1. Introdução

O milho roxo (maíz morado) é uma variedade de milho (*Zea mays* L.) nativa cultivada no Peru, em torno da Cordilheira dos Andes. No Peru, as sementes desse milho são utilizadas na gastronomia para o preparo da *chicha morada* (bebida refrescante), da *mazamorra morada* (sobremesa) além de ser fonte de pigmentos, principalmente da antocianina cianidina 3-glucosídeo, que tem propriedades antioxidantes (Harakotr et al., 2014), anticancerígenas (Kamei et al., 1995), antimutagênicas e antidiabéticas (Tsuda et al., 2003; He & Giusti, 2010). A demanda do milho roxo peruano ao nível mundial tem aumentado nos últimos anos. Em 2016 as exportações foram 12% superiores em comparação com o ano de 2015, sendo os EUA o principal país de destino (AGRODATAPERU, 2017).

Por ser considerado um produto orgânico, o milho roxo necessita algumas certificações relacionadas com sua produção orgânica para sua comercialização (Andersen, 2003) mas não considera os limites máximos de concentração de micotoxinas nesse alimento. Segundo Ruiz de Galarreta et al. (2015), não existe diferença significativa na contaminação por fumonisinas no milho orgânico (80-1250 µg/kg) e no milho proveniente da agricultura convencional (110-2400 µg/kg), porém quanto à contaminação do milho roxo, ainda não há pesquisas disponíveis com essa informação.

As micotoxinas são metabolitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos (Al-Taher, et al., 2017). Na saúde pública as micotoxinas de maior importância são a aflatoxina B₁ que tem propriedades mutagênicas e carcinogênicas (Bennett & Klich, 2003; IARC, 2012); fumonisina B₁, relacionada com a incidência elevada de câncer de esôfago em humanos no Sul da África e China (Rheeder, 1992); ocratoxina A que é considerada nefrotóxica (Krogh et al., 1977); zearalenona que é uma micotoxina estrogênica (Chang, Kurtz, & Mirocha, 1979); tricotecenos não macrocíclicos do grupo A (toxina T-2, toxina HT-2 e diacetoxiscirpenol) que são relacionados com imunotoxicidade e citotoxicidade; e tricotecenos do grupo B (deoxinivalenol, 3-acetil-DON e 15-acetil-DON, nivalenol e fusarenona-X), relacionadas com distúrbios gastrointestinais (Milicevic, Skrinjar, & Baltic, 2010). Diversos fatores ambientais podem se associar promovendo a produção de micotoxinas como a temperatura, atividade de água (Aw) (Magan, Gayley, & Lacey, 1988), umidade (Marin et al., 1995), tensão de oxigênio, pH (Keller, Sullivan & Chirtel, 1997), entre outros.

Cerca de 25% dos cereais em nível mundial estão contaminados com alguma micotoxina e a maioria dos fungos produtores de micotoxinas são capazes de produzir mais de uma micotoxina, ocasionando a co-ocorrência nos insumos e alimentos, sendo uma preocupação para a saúde pública pela possível sinergia ou efeito associado (De Saeger, Audenaert, & Croubels, 2016).

Os países da Comunidade Europeia têm uma legislação específica e detalhada quanto aos limites máximos toleráveis (LMT) de micotoxinas em alimentos (CE, 2006, 2007, 2013). Nos Estados Unidos a Food and Drug Administration orienta sobre os níveis de ação de algumas micotoxinas (FDA, 2000; 2001; 2010). Na América do Sul os limites foram estabelecidos pelo Mercado Comum do Sul (MERCOSUR, 2002). No entanto, o Brasil possui uma legislação específica que dispõe sobre a maior quantidade de micotoxinas e categorias alimentares

(ANVISA, 2011; 2013; 2017) e o Peru avalia somente a contaminação por aflatoxinas e ocratoxina A na páprica e nozes do Brasil (SENASA, 2014).

Considerando que o milho roxo é um insumo utilizado na gastronomia, principalmente peruana, é necessário que se verifique a contaminação por micotoxinas, estabelecendo-se os riscos à saúde humana. Esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de determinar e quantificar micotoxinas no milho roxo peruano e comparar os níveis com as legislações da Comunidade Europeia, Estados Unidos e Brasil. Esta é a primeira pesquisa que avalia a ocorrência de micotoxinas no milho roxo peruano.

1. Material e Métodos

1.1. Amostras

Aproximadamente 200 g de amostras de milho roxo (n=82), foram obtidas em comércios locais de venda fracionada do Peru durante dois períodos: nos meses de dezembro de 2015 a março de 2016 (n=20) e nos meses de março a abril de 2017 (n=62). Após a coleta, as amostras foram identificadas, moídas em moinho ultracentrífugo ZM 200 (Retsch - Alemanha) com peneira de 1 mm, e conservadas sob temperatura de -18 °C até o momento do preparo para as análises.

1.2. Análises de micotoxinas

1.2.1. Padrões analíticas e reagentes

Os padrões analíticos das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (AFs), fumonisinas B₁ e B₂ (FBs), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA) e tricotecenos (TRCs): deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), fusarenona X (FUS), diacetoxiscirpenol (DAS), 3 acetil-DON (3ac-DON), toxina HT-2 e toxina T-2, foram adquiridos da Sigma Aldrich (USA). Metanol, acetonitrila, ácido fórmico e acetato de amônia (grau HPLC) foram adquiridos da J.T. Baker (USA). Água ultrapura foi obtida através de um sistema de purificação de água Milli-Q gradiente A10 (Millipore - USA).

1.2.2. Preparação e análises das amostras

Com objetivo de determinar níveis mais baixos de cada micotoxina, foram empregados diferentes métodos de extração e determinação para cada grupo de micotoxinas. Para as análises de AFs, foi adaptado o método proposto Sulyok et al. (2007), foram pesadas 5 g da amostra e adicionados 20 mL da solução de acetonitrila/água [5:1 (v/v)], colocada em agitação em mesa agitadora (Lucadema, Brasil) a 71 rpm por 1 hora. Posteriormente o extrato foi diluído com uma solução de metanol/água [1:1 (v/v)] e 10 µL injetado para análise que foi executada utilizando um cromatógrafo HPLC Série 1200 Infinity (Agilent Technologies Inc., EUA) acoplado a um espectrômetro de massas 5500 QTRAP (SCIEX, Canadá), equipado com fonte de ionização por Electrospray (ESI) em modo positivo, com fases móveis na eluição por gradiente compostas de metanol:água:acetato de amônia [95:4:1 (v/v/v)] (solução A) e água:acetato de amônia [99:1 (v/v)] (solução B), a separação cromatográfica foi realizada à 30 °C com coluna Eclipse XDB-C₈ (4,6 x 150 mm, diâmetro de partícula de 5 µm) (Agilent Technologies Inc., EUA). Os tempos de retenção (minutos) para cada analito foram AFB₁=4,1; AFB₂=3,7; AFG₁=3,2 e AFG₂=2,9.

Para as análises de FBs, foi utilizado o método seguido por Mallmann et al. (2013), em 3 g de amostra foram usados 15 mL da solução de metanol/água [7:3 (v/v)], agitou-se por 20 minutos em agitador tipo shaker MA563 (Marconi, Brasil), e o extrato foi diluído com uma solução de acetonitrila/água/ácido fórmico [5:4:1 (v/v/v)] e 10 µL injetado utilizando um cromatógrafo HPLC Série 1200 Infinity (Agilent Technologies Inc., EUA) acoplado a um espectrômetro de massas API 5000 (SCIEX, Canadá), equipado com fonte de ionização por Electrospray (ESI) em modo positivo, com fases móveis na eluição por gradiente compostas de água:ácido fórmico [95:5 (v/v)] e acetonitrila:ácido fórmico [95:5 (v/v)]. A separação cromatográfica foi realizada com coluna Eclipse XDB-C₈ (4,6 x 150 mm, diâmetro de partícula de 5 µm) (Agilent Technologies Inc., EUA) à 40 °C de temperatura. Os tempos de retenção (minutos) de cada analito foram FB₁=3,2 e FB₂=7,2.

Para as análises de OTA foi adaptado o método proposto por Sulyok et al. (2006), foram pesados 3 g de amostra, foi adicionado 12 mL da solução de acetonitrila/água [5:1 (v/v)] acidificada com 1% de ácido acético, colocou-se no agitador tipo shaker MA563 (Marconi, Brasil) por 10 min. Posteriormente o extrato foi diluído com uma solução de acetonitrila/água [1:1 (v/v)] e 10 µL injetado usando um cromatógrafo HPLC Série 1200 Infinity (Agilent Technologies Inc., USA) acoplado a um espectrômetro de massas API 5000 (SCIEX, Canadá), equipado com fonte de ionização por Electrospray (ESI) em modo positivo, com fases móveis na eluição por gradiente compostas de água:ácido fórmico [95:5 (v/v)] e acetonitrila:ácido fórmico [95:5 (v/v)]. A separação cromatográfica foi realizada com coluna Zorbax SB-C₁₈ (4,6 x 150 mm, diâmetro de partícula de 5 µm) (Agilent Technologies Inc., EUA) à temperatura de 40 °C. O tempo de retenção desse analito foi de 5,8 min.

Para as análises de DON e ZEA foi adaptado o método proposto por Berthiller et al. (2005), em 3 g de amostra, foi adicionado 24 mL da solução metanol/água [7:3 (v/v)]. Posteriormente foi colocado em agitação por 20 minutos em agitador tipo shaker MA563

(Marconi, Brasil). O extrato foi diluído com uma solução de metanol/água/acetato de amônio 1M [90:9:1 (v/v/v)] e 10 µL injetado utilizando cromatógrafo HPLC Série 1200 Infinity (Agilent Technologies Inc., USA) acoplado a um espectrômetro de massas 4000 QTRAP (SCIEX, Canadá), equipado com fonte de ionização por Electrospray (ESI) em modo positivo, com fases móveis na eluição por gradiente composta de metanol:água:acetato de amônia [90:9:1 (v/v/v)] e água:acetato de amônia [90:10 (v/v)]. A separação cromatográfica foi realizada com coluna Zorbax SB-C₁₈ (4,6 x 150 mm, diâmetro de partícula de 5 µm) (Agilent Technologies Inc., EUA) à temperatura de 40 °C. Os tempos de retenção (minutos) de cada analito foram DON=4,7 e ZEA=9,3.

Para as análises de TRCs foi adaptado o método proposto por Sugita-Konsihi et al. (2006), pesaram-se 50 g de amostra, foi adicionado 100 mL de uma solução de acetonitrila/água [6:1 (v/v)], colocou-se em agitação por 3 min. Posteriormente o extrato foi filtrado com papel filtro qualitativo número 4 e 10 mL evaporado sob fluxo de nitrogênio a 65 °C. Posteriormente foi ressuspenso em uma solução de acetonitrila/água [6:1 (v/v)], colocado em agitação por 1 min, e passado por um cartucho MycoSep® 227 Trich+ (Romers Lab, Brasil) e o eluato obtido foi diluído com metanol/água [1:1 (v/v)] e 10 µL injetado usando um cromatógrafo HPLC Série 1200 Infinity (Agilent Technologies Inc., USA) acoplado a um espectrômetro de massas API 5000 (SCIEX, Canadá), equipado com fonte de ionização por Electrospray (ESI) em modo positivo e negativo, com fases móveis na eluição por gradiente composta de metanol:água:acetato de amônia [90:9:1 (v/v/v)] e água:acetato de amônia [99:1 (v/v)]. A separação cromatográfica foi realizada com coluna Zorbax SB-C₈ (4,6 x 150 mm, diâmetro de partícula de 5 µm) (Agilent Technologies Inc., EUA) à temperatura de 40 °C. Os tempos de retenção (minutos) de cada analito foram DAS=8,3; HT-2=8,7; T-2=9,0; NIV=5,6; FUS=6,8 e 3ac-DON=3,7.

1.2.3. Garantia de qualidade analítica

Para garantir a qualidade analítica foram estabelecidos os limites de quantificação (LOQ) e os limites de detecção (LOD) através da relação sinal/ruído (LOQ=10/1, LOD=3/1). Para o cálculo da estimativa de recuperação de cada analito foram realizadas análises de sete replicatas de amostras fortificadas em três diferentes níveis de concentração do analito de interesse. A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação (R^2), calculado após injeção em triplicata de curvas analíticas com sete diferentes níveis de concentração. Foram utilizadas curvas analíticas com coeficientes de determinação maiores que $R^2 > 0,99$. O efeito matriz de cada método foi avaliado através da plotagem de curvas preparadas no solvente versus curvas preparadas com adição de matriz.

1.3. Atividade de água (A_w)

Aproximadamente 7 g de cada amostra moída foi colocada na câmara do equipamento AquaLab (Decagon Devices Inc., USA) para determinar a A_w . O equipamento condiciona a amostra para a leitura a 25 °C por meio de um sistema termostático e faz a leitura de A_w através da constante dielétrica, polímero higroscópico e eletrodo poroso formando um sistema para medida da pressão de vapor de água na câmara. A faixa de leitura do equipamento é de 0,050 a 1,000; com exatidão de $\pm 0,01$.

1.4. Análises estatísticas

A média e desvio padrão de cada variável foi calculada utilizando o *software* Microsoft Excel (Microsoft Excel 2016 MSO, Microsoft Corporation, Redmond, WA). A homogeneidade

de variâncias das curvas preparadas no solvente e das curvas preparadas com adição da matriz foi avaliada através da aplicação do teste F (Fischer-Snedecor), empregando o *software* Microsoft Excel (Microsoft Excel 2016 MSO, Microsoft Corporation, Redmond, WA). A correlação das concentrações de micotoxinas e A_w foi avaliada pela aplicação do teste de correlação de postos de Spearman ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Statgraphics Centurion XV (Statgraphics Centurion 15.2.11, Manugistics Inc., Rockville, MD).

2. Resultados e discussão

2.1 Análises de micotoxinas

A ocorrência de micotoxinas nas amostras coletadas nos dois períodos de amostragem é apresentada na tabela 1. As micotoxinas quantificadas prevalentes no milho roxo peruano foram as AFs e FBs. AFs contaminaram 64,6% (53) das amostras, com média de 1,9 $\mu\text{g/kg}$ (1-17 $\mu\text{g/kg}$). Com positividade semelhante, 63,4% (52) das amostras estavam contaminadas com FBs, com média de 1651,1 $\mu\text{g/kg}$ (125-27490 $\mu\text{g/kg}$). Os níveis mais altos de contaminação foram constatados no primeiro período de amostragem, com 75% (15) de amostras positivas para AFs e FBs e 5% (1) para zearalenona. A OTA e os TRCs não apresentaram concentrações quantificáveis. Das 82 amostras de milho roxo analisadas, 45,1% (37) apresentaram co-ocorrência de AFs e FBs e somente uma amostra apresentou co-ocorrência de AFs, FBs e ZEA.

Em concordância com nossos resultados, Mendes de Souza et al. (2013) reportaram 100% de prevalência de FBs em 74 amostras de milho do Brasil com valores entre 41 e 8760 $\mu\text{g/kg}$. Assim como também, Rodrigues & Naehrer (2012), analisaram amostras de milho da América do Sul, encontrando maior prevalência de FBs (92%), em concentrações de 859 a

53700 µg/kg, ZEA (43%) em concentrações de 40 a 1800 µg/kg e AFs (25%) em concentrações de 1,4 a 18 µg/kg. Pinotti et al. (2016), concluíram que as micotoxinas mais prevalentes na contaminação de alimentos em nível global são AFs, DON, FBs, OTA, T-2 e ZEA, sendo as FBs as de maior ocorrência, com mais de 80% na América do Sul.

Logrieco et al. (1993) detectaram a presença de espécies de fungos do gênero *Fusarium*, e reportaram ausência de contaminação de DAS e T-2 no milho peruano. No entanto, a European Food Safe Authority (EFSA) reportou um estudo com 246 amostras de milho provenientes da Europa, Ásia e Argentina nos anos de 2007 a 2012, no qual verificou-se uma concentração média de 318 µg/kg de DON (EFSA, 2014). Na pesquisa realizada por Khatoon et al. (2012) em que foram analisadas 65 amostras de milho do Paquistão, 12,3% delas estavam contaminadas por NIV (500-2650 µg/kg), 9,2% por DON (136-2625 µg/kg) e 7,7% por 3acetil-DON (100-850 µg/kg), com valores médios de 1326, 1549 e 356 µg/kg, respectivamente. Nesta mesma pesquisa foi detectada uma prevalência de 9,2% de DAS (364–750 µg/kg); 6,1% de T-2 (143–1125 µg/kg) e 6,1% de HT-2 (100–500 µg/kg).

A ocorrência de mais de uma micotoxina no milho também foi verificada no Brasil por Oliveira et al. (2017), com mais de 73%, sendo a combinação de FBs e ZEA a mais prevalente. Por outro lado, em estudo realizado com amostras de milho da Argentina, a co-ocorrência de AFs e FBs foi de 8,3% e de ZEA e FBs foi de 2% das amostras (Garrido et al., 2012).

Considerando que, na cadeia produtiva do milho roxo no Peru, a secagem muitas vezes é realizada a céu aberto, exposto às intempéries climáticas e constantes mudanças de temperatura (PYMAGROS, 2005), estes fatores podem ter influenciado na contaminação por micotoxinas abordadas neste estudo, pois de acordo com as pesquisas desenvolvidas por Paterson & Lima (2011) e Pitt et al. (2013), a produção de micotoxinas pelos fungos é favorecida pelo cultivo inadequado, condições climáticas, deficiência na secagem e armazenamento.

Constatou-se que 12% (10) das amostras de milho roxo apresentaram níveis superiores aos LMT estabelecidos pela União Europeia para FBs (LMT=1000 µg/kg) e apenas uma amostra para AFs (LMT=10 µg/kg). As demais micotoxinas pesquisadas estavam abaixo dos LMT. Para a legislação dos Estados Unidos 11% (9) das amostras apresentaram concentrações superiores aos LMT para FBs (LMT=4000 µg/kg). No entanto, considerando-se a legislação brasileira, 9,8% (8) das amostras apresentaram concentrações superiores aos LMT para FBs (LMT=5000 µg/kg), conforme a tabela 2.

2.2. Garantia de qualidade analítica

Os valores encontrados para os LOD, LOQ e recuperação são descritos na tabela 3. Todos os métodos utilizados apresentaram valores de LOQ abaixo dos LMT para todas micotoxinas analisadas.

O coeficiente de determinação de cada analito testado foi superior a 0,9997. Os valores das médias das variâncias das curvas com matriz e sem matriz não apresentaram diferenças significativas pelo teste F (Fischer-Snedecor), considerando-se que não apresentaram efeito matriz.

2.3. Atividade de água (Aw)

A média de Aw das amostras do primeiro período de amostragem foi de 0,92 (0,73–0,97) e do segundo período foi de 0,91 (0,83–0,97). Não houve correlação ($P>0,05$) da Aw com os níveis de AFs e FBs encontrados por período e no período total. Não há informações disponíveis sobre o local de cultivo, e as condições de transporte e armazenamento das amostras, mas presumimos que a Aw pode ser sido alterada no decorrer do tempo. A produção

de micotoxinas é multifatorial, sendo a Aw um desses fatores, Marín et al. (1995), constataram que fungos do gênero *Fusarium* produziram concentrações mais altas de FB₁ e FB₂ com Aw de 0,96 e 0,97 a temperaturas de 25 °C e 30 °C, e redução das concentrações com Aw de 0,92. Em outra pesquisa desenvolvida por Giorni et al. (2008), observaram que a produção de AFB₁ em grãos de milho inoculados com *Aspergillus flavus* e armazenados a 25 °C por 21 dias, a Aw de 0,95 resultou em maior quantidade de AFB₁ e que em atmosfera controlada (50% de CO₂) a produção de AFB₁ foi reduzida significativamente.

3. Conclusões

A presente pesquisa é pioneira na avaliação da ocorrência de micotoxinas em milho roxo peruano. As micotoxinas mais prevalentes foram as AFs, seguida pelas FBs e uma amostra apresentou contaminação por ZEA. Não foi observada relação direta entre a Aw e os níveis de micotoxinas reportados. Não foram identificadas concentrações quantificáveis de OTA e TRCs nas 82 amostras. Consideramos que é necessário implementar o monitoramento e controle das micotoxinas na cadeia produtiva do milho roxo, objetivando diminuir os riscos à saúde pública, contemplando a ocorrência individual e múltipla destas toxinas, bem como a implementação de uma legislação específica para este produto. Pesquisas adicionais precisam ser efetuadas com o objetivo de elucidar como a prevalência e concentração das micotoxinas no milho roxo são influenciadas pelas condições climáticas e produtivas.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo para a primeira autora.

Referências

- ABNT, Brazilian Association of Technical Standards. NBR ISO/IEC 17.025. 2005. Available from: <http://www.smar.net.com.br/qualidade/metrologia/17025.pdf>. Accessed 16.12.16.
- AGRODATAPERU. Presents information on Peru's agricultural trade in Peru (2017). Available from: <https://www.agrodataperu.com/> Accessed 26.01.17.
- Al-Taher, F., Cappozzo, J., Zweigenbaum, J., Lee, H. J., Jackson, L., & Ryu, D. (2017). Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. *Food Control*, 72, 27-35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.027>. Accessed 12.05.17.
- Andersen, M. Regional Technical Assistance Unit. FAO (2003). Is certification something to me? . In A practical guide on why, how and with whom to certify agricultural products for export (pp. 32).
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516. DOI: 10.1128/cmr.16.3.497-516.2003.
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G. & Krska, R (2005). Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1062(2), 209-216. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304020205>. Accessed 02.07.16. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.11.011.
- Brasil. (2011). Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA). Commission Decision No 07 of 18 february 2011. Laying down the maximum tolerated level (MTL) of mycotoxins in food. Brazilian Health Ministry, Brasília, DF, Brazil, of 22/03/2011. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html.
- Brasil (2013). Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA). Commission Decision RDC Nº 59, of 26 of December of 2013. Provides for the extension of the periods established in articles 11 and 12 and respective annexes III and IV of the resolution of the Commission Decision RDC

n. 7, of 18 of February 2011 that has maximum tolerated limits (MTL) for mycotoxins in foods. Brazilian Health Ministry, Brasília, DF, Brazil, of 26/12/2013. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0059_26_12_2013.pdf.

Brasil (2017). Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA). Commission Decision RDC Nº 7, of 08 of February 2017. Provides for maximum tolerated limits (MTL) for mycotoxins in food, to amend the LMTs of mycotoxin deoxynivalenol (DON) in wheat and wheat products ready to be offered to the consumer and the deadlines for their application.

Chang, K., Kurtz, H.J., Mirocha, C.J. (1979). Effects of the mycotoxin zearalenone on swine reproduction. *American Journal of Veterinary Research*, 40(9), 1260-1267.

De Saeger, S., Audenaert, K., & Croubels, S. (2016). Report from the 5th International Symposium on Mycotoxins and Toxigenic Moulds: Challenges and perspectives (MYTOX) held in Ghent, Belgium, May 2016. *Toxins (Basel)*, 8(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4885061/pdf/toxins-08-00146.pdf>. DOI: 10.3390/toxins8050146.

EC, European Commission. (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of European Union*. L 364/5. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1499891349461&uri=CELEX:32006R1881>.

EC, European Commission. (2007). Commission Regulation (EC) No. 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. *Official Journal of European Union*. L 255/14. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1499891119271&uri=CELEX:32007R1126>.

EC, European Commission. (2013). Commission recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. *Official Journal of the European Union*, 9(12), 2481. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013H0165&from=EN>.

EFSA, European Food Safety Authority (2014). Evaluation of the increase of risk for public health related to a possible temporary derogation from the maximum level of deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins for maize and maize products. *EFSA Journal*, 12(5). DOI: 10.2903/j.efsa.2014.3699.

FDA, U.S. Food and Drug Administration (2000). Guidance for industry: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed—Aflatoxin. Available online:

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/ucm077969.htm#afla>

FDA, U.S. Food and Drug Administration (2001). Guidance for industry: Fumonisin levels in human foods and animal feeds; final guidance (June 6, 2000; revised November 9, 2001). Available online:

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/ucm109231.htm>

FDA, U.S. Food and Drug Administration (2010). Guidance for industry and FDA: Advisory levels for deoxynivalenol (DON) in finished wheat products for human consumption and grains and grain by-products used for animal feed (June 29, 2010; Revised July 7, 2010).

Garrido, C. E., Hernández Pezzani, C., & Pacin, A. (2012). Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.), from 1999 to 2010. *Food Control*, 25(2), 660-665. Available from: <http://sci-hub.ac/10.1016/j.foodcont.2011.11.043>. DOI:

10.1016/j.foodcont.2011.11.043. Accessed 23.05.17.

Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., & Magan, N. (2008). Effect of aw and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 109 - 113.

He, J., Giusti, M.M. (2010). Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 163–187. DOI: 10.1146/annurev.food.080708.100754. Accessed 16.04.17.

- IARC, International Agency for Research on Cancer (2012). A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations, 100.
- Kamei, H. et al. (1995). Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Investigation* 13 (6), 590-594.
- Keller, S.M., Sullivan, T.M., & Chirtel, S. (1997). Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19, 305–309.
- Khatoon, S., Hanif, N. Q., Tahira, I., Sultana, N., Sultana, K. & Ayub, N. (2012). Natural occurrence of aflatoxins, zearalenone and trichothecenes in maize grown in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 44(1), 231-236. Available from: [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/44\(1\)/33.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/44(1)/33.pdf). Accessed 02.06.17.
- Krogh, P., Hald, B., Plestina, R., Ceovic, S. (1977). Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin a: preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology*, 85B: 238–240. doi:10.1111/j.1699-0463.1977.tb01702.x
- Logrieco, A., Moretti, A., Altomare, C., Bottalico, A., & Carbonell, E. (1993). Occurrence and toxicity of *Fusarium subglutinans* from Peruvian maize. *Mycopathologia*, 122(3), 185-90. Available from: <http://sci-hub.ac/10.1007/BF01103480>. DOI: 10.1007/BF01103480. Accessed 12.05.17.
- Magan, N., Cayley, G.R., & Lacey, J. (1988). Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(5), 1113–1117.
- Mallmann, A. O. et al. (2013). Two sampling plans for fumonisins analysis in maize. *Ciência Rural*, 43(3), 551-558. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013000300029>.

- Marin S., Sanchis V., Vinas, I., Canela, R., & Magan, N. (1995). Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 298–301
- Mendes de Souza, M. L., Sulyok, M., Freitas-Silva, O., Soares Costa, S., Brabet, C., Machinski Junior, M., et al. (2013). Cooccurrence of mycotoxins in maize and poultry feeds from Brazil by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *The Scientific World Journal*. Available from: <http://dx.Doi.org/10.1155/2013/427369>, 427369 (9 pp).
- MERCOSUR, Southern Common Market (2002). MERCOSUR/GMC/RES. N° 25/02 Mercosur technical regulation on maximum permissible aflatoxin limits in milk, peanuts and maize (Derogation of Resolution GMC N° 56/94). In M. M. C. d. Sur (Ed.). Buenos Aires, Argentina.
- Milicevic, D. R., Skrinjar, M., & Baltic, T. (2010). Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. *Toxins (Basel)*, 2(4), 572–592. DOI: 10.3390/toxins2040572.
- Oliveira, M. S., Rocha, A., Sulyok, M., Krska, R., & Mallmann, C. A. (2017). Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. *Food Control, Part B*, 73, 127–132. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.07.033.
- Paterson, R. R. M., & Lima, N. (2011). Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International*, 44 (9), 2555–2566. Available from: https://www.researchgate.net/publication/248425847_How_climate_change_affects_mycotoxins_in_food. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.05.038. Accessed 19.05.17.
- Peru (2014). National Agrarian Health Service (SENASA). National monitoring program of contaminants in primary agricultura foods and feed. Resolution – RD No 0056-2014-MINAGRI-SENASA-DIAIA of 25 August 2014.
- Pinotti, L., Ottoboni, M., Giromini, C., Dell'Orto, V., & Cheli, F. (2016). Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: A focus on cereal byproducts. *Toxins (Basel)*, 8(2). Available from: https://www.scienceopen.com/document_file/193c7f66-397c-494c-a7f5-

- f9ddb6db5b6e/PubMedCentral/193c7f66-397c-494c-a7f5-f9ddb6db5b6e.pdf. DOI: 10.3390/toxins8020045. Accessed 20.05.17.
- Pitt, J. I., Taniwaki, M.H., Cole, M.B. (2013). Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of food safety objectives. *Food Control*, 32(1), 205-215. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.11.023.
- PYMAGROS, Producers and agricultural markets of the sierra of Peru (2005). Research to know the adaptation of 5 varieties of Purple corn in the localities of Chuquibamba, Siguis, and San Felipe, in the district of Cachachi, Province of Cajabamba.
- Rheeder, J. P.; Marasas, W. F. O.; Thiel, P. G.; Sydenham, E.W.; Shephard, G. S.; Schalkwijk, D. J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathologia*, 82(3) 353-357.
- Rodrigues, I., & Naehrer, A. (2012). Three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins*, 4(9), 663-675. Available from: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/4/9/663>>. DOI: 10.3390/toxins4090663. Accessed 19.05.17.
- Ruiz de Galarreta, J. I., Butrón, A., Ortiz-Barredo, A., Malvar, R. A., Ordás, A., Landa, A., & Revilla, P. (2015). Mycotoxins in maize grains grown in organic and conventional agriculture. *Food Control*, 52, 98-102. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.12.016.
- Sugita-Konsihi, Y., Tanaka, T., Tabata, S., Nakajima, M., Nouno, M., Nakaie, Y., . . . Takatori, K. (2006). Validation of an HPLC analytical method coupled to a multifunctional clean-up column for the determination of deoxynivalenol. *Mycopathologia*, 161(4), 239-243. DOI: 10.1007/s11046-006-0260-1.
- Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 2649–2659. DOI: 10.1002/rcm.2640.

498 Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. (2007). A liquid chromatography/tandem
499 mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its
500 application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical*
501 *Chemistry* 389, 1505–1523. DOI: 10.1007/s00216-007-1542-2.

502 **Tabela 1**503 Contaminação média, prevalência ($\% \geq \text{LOQ}^*$), média das amostras positivas e contaminação máxima em amostras de milho roxo peruano.

504

Período	n	Micotoxina	Média (µg/kg)	Desvio padrão	$\% \geq \text{LOQ}^*$	Média de amostras positivas (µg/kg)	Desvio padrão	Máximo (µg/kg)
Primeiro: dez/2015 a mar/2016	20	AFs	4,5	4,3	75,0	5,9	4,1	17
	20	FBs	6196,8	8507,7	75,0	8262,3	8941,3	27490
	20	ZEA	2,6	6,6	5,0	24,4	-	24,4
	20	DON / OTA / TRCs	0	0	0	0	0	0
Segundo: mar e abr/2017	62	AFs	1,4	0,7	23,6	1,8	0,6	2,9
	62	FBs	184,7	162,5	59,7	285	137,1	762
	62	ZEA	0,3	1,24	0	0	0	0
	62	DON / OTA / TRCs	0	0	0	0	0	0
Total	82	AFs	1,9	1,8	64,6	2,1	2,0	17
	82	FBs	1651,1	4872,9	63,4	2586,1	5989,6	27490
	82	ZEA	0,9	3,5	1,2	24,4	-	24,4
	82	DON / OTA / TRCs	0	0	0	0	0	0

505

506 *LOQ=limite de quantificação. AFs=aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$), LOQ=1 µg/kg; FBs=fumonisinás (B_1+B_2), LOQ=125 µg/kg; ZEA=zearaleno na,

507 LOQ=20 µg/kg; DON=deoxinivalenol, LOQ=200 µg/kg; OTA=ocratoxina A, LOQ=2,5 µg/kg; TRCs=nivalenol, fusarenona X, diacetoxiscirpenol,

508 3-acetil-DON, HT-2 e T-2, LOQ=100 µg/kg.

Tabela 2

Limite Máximo Tolerável (LMT) de micotoxinas estabelecidos pela legislação da Europa, dos Estados Unidos e do Brasil para o milho e percentual de amostras acima do LMT de micotoxinas.

Micotoxina	LMT – Europa ^a		LMT – USA ^b		LMT – Brasil ^c	
	LMT (µg/kg)	% > LMT	LMT (µg/kg)	% > LMT	LMT (µg/kg)	% > LMT
AFs ^d	10	1,2	20	0	20	0
FBs ^e	1000	4,6	4000	11	5000	9,8
Total ZEA ^f	100	0	350	0	40	0
(n=82) DON ^g	1750	0	1000	0	3000	0
OTA ^h	5	0	*	0	20	0
TRCs ⁱ	100	0	*	0	*	0

^aCommission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006; Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007; Commission Recommendation of 27 March 2013 (2013/165/EU). ^bFDA, (U.S. Food and Drug Administration). Guidance for industry: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed-Aflatoxin; Guidance for industry: Fumonisin levels in human foods and animal feeds; final guidance (June 6, 2000; revised November 9, 2001). ^cBrasil. Resolution - RDC No. 7/2011; RDC No. 59/2013; RDC No. 138/2017. ^dAFs: aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂), LOQ=1 µg/kg. ^eFBs: fumonisinas (B₁+B₂), LOQ=125 µg/kg, ^fZEA: zearalenona, LOQ=20 µg/kg. ^gDON: deoxinivalenol, LOQ=200 µg/kg. ^hOTA: ocratoxina A, LOQ=2,5 µg/kg. ⁱTRCs: nivalenol, fusarenona X, diacetoxiscirpenol, 3 acetil-DON, HT-2 e T-2, LOQ 100 µg/kg.*LMT não estabelecido.

Tabela 3

Limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD) e porcentagens de recuperação dos métodos empregado nas análises de micotoxinas no milho roxo peruano.

Micotoxina	LOQ (µg/kg)	LOD (µg/kg)	Recuperação (%)
Aflatoxina B ₁	1	0,4	98
Aflatoxina B ₂	1	0,6	97
Aflatoxina G ₁	1	0,6	99
Aflatoxina G ₂	1	0,6	94
Fumonisina B ₁	125	10,0	94
Fumonisina B ₂	125	20,0	94
Deoxinivalenol	125	50,0	80
Ocratoxina A	2,5	0,5	80
Zearalenona	20	3,0	85
Tricotecenos ^a	100	50,0	90

^aTricotecenos: nivaleol, fusarenona X, diacetoxiscirpenol, 3 acetil-DON, toxina HT-2 e toxina T-2.

4. CONCLUSÃO

Esta é a primeira pesquisa que avalia a ocorrência de micotoxinas no milho roxo peruano analisado por LC-MS/MS. Constatou-se que as micotoxinas mais prevalentes foram as AFs, seguida pelas FBs e ZEA. Não foram identificadas concentrações quantificáveis de OTA e TRICO. Pesquisas devem ser desenvolvidas para identificar os fatores que influenciam na concentração individual e múltipla destas micotoxinas e disponibilizar informações que tenham o propósito de reduzir os riscos à saúde pública, servindo como base para o estabelecimento de regulamentações com limites máximos de micotoxinas neste produto.

REFERÊNCIAS

- ABIA, W. A. et al. Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Food Control**. v.31, n.2, p.438-453. 2013.
- ABRUNHOSA, L. et al. Micotoxinas detectadas en productos alimenticios en Portugal: revisión. **Revista Bio Ciencias**. v.2, n.1, p.5-31. 2012.
- AGRODATA PERU. Apresenta informação de comércio exterior agropecuário do Peru. Capturado em 26 de janeiro de 2017. Disponível na internet em: <https://www.agrodataperu.com/>
- ALI, N. et al. Deoxynivalenol exposure assessment for pregnant women in Bangladesh. **Toxins**. v.7, p. 3845-3857. 2015. DOI: 10.3390/toxins7103845.
- ALPERT, M.E. et al. Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda. **Cancer**. v. 28, p.253-260. 1971.
- ALSHANNAQ, A.; YU, J-H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.14, n.632. 2017. Disponível na internet em: DOI: 10.3390/ijerph14060632
- ÁLVAREZ, L. et al. Immunotoxic effects of Ochratoxin A in wistar rats after oral administration. **Food and Chemical Toxicology**. v.42, n.5, p.825-834.
- ANDERSEN, M. Unidad Regional de Asistencia Técnica. FAO. ¿Es la certificación algo para mí? - Una guía práctica sobre por qué, cómo y con quién certificar productos agrícolas para la exportación. San José; Costa Rica: RUTA, 2003, 32 p.
- ARIÑO, A. Informe relativo a las micotoxinas fumonisinas. Online Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria, 2008. Capturado em 05/ maio. 2016. Disponível na internet em: http://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Seguridad_Agroalimentaria/Agencia_Aragonesa_Seguridad_Alimentaria/Dictámenes_informes/AASA/INFORME_RELATIVO_MICOTOXINAS_FUMONISINAS.pdf.
- ARROYO, J.; RAEZ, E.; RODRÍGUEZ, M. et al. Reducción del colesterol y aumento de La capacidad antioxidante por el consumo crónico de la capacidad antioxidante para el consumo crónico del maíz morado (*Zea mays* L) en ratas hipercoleterolémicas. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**. v.24, n.2, p.157-162, 2007
- ASSUNÇÃO, R.; SILVA, M.J., ALVITO, P. Challenges in risk assessment of multiple mycotoxins in food. **World Mycotoxin Journal**. v.9. n. 5, p.791-811. 2016
- BELHASSEN, H. et al. Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: A case-control study in Tunisia. **Chemosphere**. v.128, p.1-6. 2015. Disponível na internet em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.055>
- BINDER, S.B. et al. Metabolism of Zearalenone and its major modified forms in pigs. **Toxins**. v.9, n.56. 2017. DOI:10.3390/toxins9020056

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução - RDC Nº 59, de 26 de dezembro de 2013. Dispõe sobre a 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 dispõe limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 138, de 8 de fevereiro de 2017 que altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017.

BRUININK, A.; RASONYI, T.; SIDLER, C. Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, ochracin and ochratoxin-alpha in vitro. *Natural Toxins*. v.6, n.5, p.173-177. 1998.

BLOUT, W. P. Turkey “X” disease. **Turkeys**. v.9, p.52, 55-58, 61, 77. 1961.

BOUTSIADOU-THEURILLAT, X.; MEIER, P.; RICHARD, C. Development and in-house Validation of a Rapid LC-MS/MS Method for the semi quantification of eleven mycotoxins in maize samples. **Food analyses**. v.68, n.10, p.716–720. 2014.

BUTLER, W.H.; GREENBLATT, M. e LIJINSKY, W. Carcinogenesis in rats by aflatoxins B₁, G₁ and B₂. **Cancer Research**. v.29, p.2206-2211. 1969

DE LA TORRE-HERNÁNDEZ, M.E. et al. Fumonisin –síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. **Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**. v.17, n.1, p.77-91. 2014.

DESHMUKH, S.K. et al. **Fungi applications and management strategies**. Nova York: Taylor & Francis Group, 2016.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **Biológico**. v.64, n.2, p.187-191. 2002.

DOMBRINK-KURTZMAN, M.A. et al. Lymphocyte cytotoxicity and erythrocytic abnormalities induced in broiler chicks by fumonisins Ba and B2 and moniliformin from *Fusarium proliferatum*. **Mycopathologia**. v.124, p.47-54. 1993. Disponível na internet em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF01103056.pdf>

EUROPEAN COMMISSION-EC. Opinion of the scientific committee on food on fusarium toxins part 31: fumonisin B₁ (FB₁). SCF/CS/CNTM/MYC/ 24 FINAL. Brussels, p.1-33. 2000. Capturado em 06/maio. 2016. Online. Disponível na Internet http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_out73_en.pdf.

EUROPEAN COMMISSION-EC. Commission Decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Brussels, 12 August 2002. Capturado em 06/maio. 2016. Disponível na Internet <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002D0657:20040110:EN:PDF>

EUROPEAN COMMISSION-EC. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Capturado em 07/maio. 2016. Online. Disponível na Internet <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20100701:EN:PDF>

EUROPEAN COMMISSION-EC. Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. **Official Journal of the European Union**, Brussels, 28 September 2007. Capturado em 06/maio. 2016. Disponível na Internet <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1126&from=EN>

EUROPEAN COMMISSION-EC. Commission Recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. 2013/165/EU. **Official Journal of the European Communities**. Brussels, 27 March 2013. Capturado em 07/maio. 2016. Disponível na Internet <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:091:0012:0015:EN:PDF>

FERNANDES, P.J. et al. High-throughput analytical strategy based on modified QuEChERS extraction and dispersive solid-phase extraction clean-up followed by liquid chromatography-triple-quadrupole tandem mass spectrometry for quantification of multiclass mycotoxins in cereals. **Food Analytical Methods**. v.8, p.841–856. 2015. DOI: 10.1007/s12161-014-9947-y

FIGUEIRA, E.; COELHO, A.; ONO, E. et al. Milho: riscos associados à contaminação por Fusarium verticillioides e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. v. 24, n. 2, p.359-378, jul./dez. 2003.

FLECK, S.C.; CHURCHWELL, M. I.; DOERGE, D.R. Metabolism and pharmacokinetics of zearalenone following oral and intravenous administration in juvenile female pigs. **Food and Chemical Toxicology**. v.106, p.193-201. 2017. Disponível na internet em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.048>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Food safety and quality. Mycotoxins. **A-Z index**. 2017. Disponível na internet em: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/en/>

FUKAMACHI, K. et al. Purple corn color suppresses ras protein level and inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in the rat. **Cancer Science** v.99, n. 9, p.1841–1846. 2008. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.00895.x

GAO, F. et al. Genotoxic effects induced by zearalenone in a human embryonic kidney cell line. **Mutation Research**. v.755, p.6-10. 2013. Disponível na internet em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.04.009>

GUILLÉN-SÁNCHEZ, J.; MORI-ARISMENDI, S.; PAUCAR-MENACHO, L. Características y propiedades funcionales del maíz morado (*Zea mays* L.) var. subnigrovioláceo. **Scientia Agropecuaria**. v.5, p.211-217. 2014.

HAGIWARA, A. et al. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Letters**. v.171, n.1, p.17-25. 2001.

HARAKOTR, B. et al. Anthocyanin, phenolics and antioxidant activity changes in purple waxy corn as affected by traditional cooking. **Food Chemistry**. v.164, n.1, p.510–517. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.069>

HOHLER, D. et al. Metabolism and excretion of ochratoxin A fed to sheep. **Journal of Animal Science**. v.77, p. 1217-1223. 1999.

HUEZA, I.M. et al. Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. **Toxins**. v.6, n.3. 2014. DOI: 10.3390/toxins6031080

HUONG, B. T. M. et al. Aflatoxins and fumonisins in rice and maize staple cereals in Northern Vietnam and dietary exposure in different ethnic groups. **Food control**. v.70, p.191-200. 2016. Disponível na internet em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.052>

IAMANAKA, B.T.; OLIVEIRA, I.S.; TANIWAKI, M.H. Micotoxinas em alimento. Resumo Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, Recife, vol. 7, p.138-161. 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER- IARC. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans**. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. v. 56. 1993.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER-IARC. Fumonisin B1. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans**. n.82, p.275–366. 2002.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER- IARC. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans**. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. v.82. 2002.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER- IARC. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations. v.100. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE DEFENSA DE LA COMPETENCIA Y DE LA PROTECCIÓN DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL. COMISIÓN NACIONAL CONTRA LA BIOPIRATERIA. Maíz morado. Año 2, n.2, fevereiro 2016. Disponível na internet em: <https://www.indecopi.gob.pe/documents/20791/369580/Bolet%C3%ADn+N%C2%BA+2+-+Tema+MA%C3%8DZ+MORADO/26d8fe5c-e027-42d6-8a30-c4fb4b441782>

JAYKUS, L-A. et al. Climate change: Implications for food safety. **Tech. rep., FAO**. 2008. Disponível na internet em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0195e/i0195e00.pdf>

KAMEI, H. et al. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. **Cancer Investigation**. v.13, n.6, p. 590-594. 1995.

KANISAWA, M.; SUZUKI, S. Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. **Gann**. v.69, p.599-600. 1978.

KIM, D-H. et al. Simultaneous determination of multi-mycotoxins in cereal grains collected from South Korea by LC/MS/MS. **Toxins**. v.9, n.106. 2014. DOI: 10.3390/toxins9030106

KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**. v.8, n.6, p.713-722. 2007. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x

KÖPPEN, R. et al. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**. n.86, p.1595-1612. 2010. DOI: 10.1007/s00253-010-2535-1.

KROGH, P. et al. Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin a: preliminary results of a survey of foodstuffs. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology**, 85B, p. 238-240. 1977.

KUCZUK, M.H. et al. Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, v.53, p.11-10. 1978.

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

MALIR, F. et al. Ochratoxin A: 50 years of research. **Toxins**, v.8, n.191. 2016. DOI: 10.3390/toxins8070191

MALLMANN, C.; DILKIN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos**. Santa Maria. Editora Sociedade Vicente Pallotti, 2007.·209p.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**. v.60, p. 218-237. 2013. Disponível na internet em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>

MERCADO COMUM DO SUL-MERCOSUL. MERCOSUR/GMC/RES. N° 25/02 Reglamento técnico mercosur sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz (Derogación de la Res. GMC N° 56/94). Buenos Aires, Argentina, 2002.

MILICEVIC, D. R.; SKRINJAR, M.; BALTIC, T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. **Toxins**, v.2, p. 572-592. 2010. DOI: 10.3390/toxins2040572.

MONROE, D.H.; EATON, D.L. Comparative effects of butylated hydroxyanisole on hepatic in vivo DNA binding and in vitro biotransformation of aflatoxin B₁ in the rat and mouse. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.90, p.401-409. 1987.

MORÉ, J. et al. Toxicité de l'ochratoxine A. I. – effet embryotoxique et tératogène chez le rat. **Annales de Recherches Vétérinaires**. v.5, n.2, p.167-178. 1974.

MWANDA, O.W.; OTIENO, C.F.; OMONGE, E. Acute aflatoxicosis: Case report. **East African Medical Journal**. v.82, p.320–324. 2005.

NJOBEH, P.B. et al. Estimation of multi-mycotoxin contamination in South African compound feeds. **Toxins**, v.4, p. 836-848. 2012. DOI: 10.3390/toxins4100836

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

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from andean purple corn (*Zea mays* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.54, n.13, p. 4557–4567. 2006.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). **Food Chemistry**, v.100, p. 956–963, 2007.

PEREIRA, M.R.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba. v.20, n.1, p.141-156. 2002.

PINTON, P.; OSWALD, I.P. Effect of Deoxynivalenol and other type B Trichothecenes on the intestine: A review. **Toxins**. v.6, p. 1615-1643. 2014. DOI:10.3390/toxins6051615

PITT, J.I.; TANIWAKI, M.H.; COLE, M.B. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of food safety objectives. **Food Control**. v.32, p.205-215. 2013. Disponível na internet em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.023>

RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. vol. 8. 2009.

RAMOS-ESCUADERO, F. et al. Purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. **Journal of medicinal food**. vol. 12, n.2. 2012. DOI 10.1089/jmf.2010.0342

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G. S.; SCHALKWIJK, D. J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathologia**. vol. 82, n.3, p. 353-357. 1992.

SEEFELDER, W.; GOSSMANN, M.; HUMPF, H. Analysis of Fumonisin B1 in *Fusarium proliferatum*-infected Asparagus Spears and Garlic Bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. vol. 50, n.10, p. 2778-2781. 2002.

SHEPHARD, G.S. Current status of mycotoxin analysis: A critical review. **Journal of AOAC International**. vol. 99, n.4, p.842-847. 2016.

SIICEX- SISTEMA INTEGRADO DE INFORMACIÓN DE COMERCIO EXTERIOR DE PERU. Capturado em 16/setembro. 2015. Disponível na internet em http://www.siicex.gob.pe/siicex/porta15ES.asp?_page_=160.00000.

SMITH, M-C. et al. Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. **Toxins**. n.8, v.24. 2016. DOI: 10.3390/toxins8040094

SOLID PERU. Conociendo la Cadena Productiva de Maíz Morado en Ayacucho. Boletín informativo. Capturado em 07/maio. 2016. Disponível na internet em <https://pt.scribd.com/doc/307366639/Maiz-Morado>, 2010.

SUZUKI, S.; SATOH, T.; YAMAZAKI, M. The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**. v.27, p. 735-744. 1977.

THIRAPHATTHANAVONG, P. et al. Preventive effect of *Zea mays* L. (purple waxy corn) on experimental diabetic cataract. **BioMedResearchInternational**. Article ID 507435. 2014. Disponível na internet <http://dx.doi.org/10.1155/2014/507435>.

TSUDA, T. et al. Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **The Journal of Nutrition**. n.133, p.2125–2130. 2003. Disponível na internet em: <http://jn.nutrition.org/content/133/7/2125.long>.

TURNER, N.W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**. v.632, p. 168–180. 2009. Disponível na internet <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010>.

VAN DONGEN, P.W.J.; DE GROOT, A.N.J.A. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v.60, p.109-116. 1995.

YAZAR, S.; OMURTAG, G. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. **International Journal of Molecular Sciences**. Istanbul, n.9, p.2062-2090. 2008. DOI: 10.3390/ijms9112062.

YIBADATIHAN, S.; JINAP, S.; MAHYUDIN, N.A. Simultaneous determination of multi-mycotoxins in palm kernel cake (PKC) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Food Additives & Contaminants: Part A**. v.31, n.14, p.2071-2079. 2014. Disponível na internet em: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2014.978396>.