

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

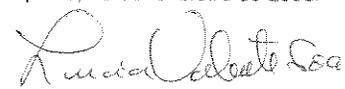
Aflatoxinas em Produtos de Tomate:
Avaliação de Metodologia Analítica e de Ocorrência

Lilian Regina Barros Mariutti
Engenheira de Alimentos

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Lilian Regina Barros Mariutti aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de fevereiro de 2003.

Campinas, 26 de fevereiro de 2003.

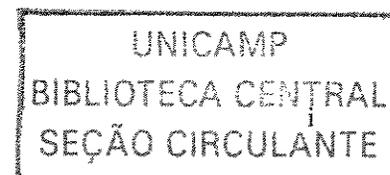

Prof. Dra. Lucia Maria Valente Soares
Presidente da Banca

Prof. Dra. Lúcia Maria Valente Soares
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Estadual de Campinas, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos

Campinas –SP
2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



UNIDADE	RC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP M339a
V	EX
TOMBO BC/	53566
PROC.	124/03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	01/05/03
Nº CPD	

CM00182315-7

BIB ID 289736

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA
PELA
BIBLIOTECA DA FEA
UNICAMP

M339a Mariutti, Lilian Regina Barros
Aflatoxinas em produtos de tomate: avaliação de metodologia analítica e de ocorrência / Lilian Regina Barros Mariutti. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Lúcia Maria Valente Soares
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Aflatoxina. 2.Tomate. 3.Micotoxinas. 4.Tomate – Produtos. I.Soares, Lúcia Maria Valente. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

Comissão Examinadora



Profa. Dra. Maria Antônia Calori Domingues

ESALQ – USP



Profa. Dra. Myrna Sabino

Instituto Adolpho Lutz – SP

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

FEA - UNICAMP (suplente)



Profa. Dra. Lucia Maria Valente Soares

FEA – UNICAMP (orientadora)

16/04/2020

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Profa. Dra. Lucia Soares que ao orientar esta dissertação sempre me incentivou a continuar apesar das dificuldades e obstáculos encontrados neste longo caminho.

Aos meus pais, sou profundamente grata pelo apoio incondicional e pelos esforços despendidos para me proporcionar uma educação sólida.

À minha irmã, Verônica, agradeço por existir e ser um dos meus maiores motivos de orgulho e incentivo para seguir em frente.

Ao meu esposo, Eduardo, pela paciência nas noites de insônia, pela compreensão a minha ansiedade, pelo seu apoio, carinho e amor.

Aos meus avós, agradeço por sempre estarem ao meu lado quando precisei, não importando se deixariam de lado suas próprias necessidades ou deveres.

Aos meus colegas de trabalho que em meu auxílio dedicaram momentos de suas vidas para que eu tivesse a disponibilidade de realizar esta dissertação.

ÍNDICE

Resumo	vii
Summary	viii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Aflatoxinas	3
2.2. Tomate e Produtos Derivados	7
2.3. A Contaminação de Tomates por Fungos	10
2.4. Índice de Howard	12
2.5. Incidência de Micotoxinas em Produtos de Tomate a Nível Mundial	13
2.6. Incidência de Micotoxinas em Produtos de Tomate a Nível Nacional	15
2.7. Ação de Compostos Inibidores na Síntese de Aflatoxinas	16
2.8. Métodos Analíticos para Determinação de Aflatoxinas em Alimentos	17
2.8.1. Extração e Limpeza	18
2.8.2. Detecção e Determinação	18
2.8.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	18
2.8.2.2. Cromatografia em Coluna	19
2.8.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	20
2.8.2.4. Cromatografia Gasosa (CG)	21
2.8.2.5. Imunoensaios	21
3. Adaptação e Avaliação de um Método Analítico para Determinação das Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ em Produtos de Tomate	23
3.1. Material e Métodos	23
3.1.1. Reagentes, Solventes e Materiais Diversos	23

3.1.2. Equipamentos	24
3.1.3. Padrões	24
3.1.4. Contaminação Artificial das Amostras de Produtos de Tomate	24
3.1.5. Adaptação da Metodologia Analítica	25
3.1.6. Avaliação do Método Modificado	28
3.2. Resultados e Discussão	29
4. Levantamento da Incidência de Aflatoxinas em Produtos de Tomate Comercializados na Região de Campinas e São Paulo	35
4.1. Introdução	35
4.2. Material e Métodos	35
4.2.1. Amostras	35
4.2.2. Método Analítico	39
4.2.3. Controle de Qualidade Analítico	39
4.3. Resultados e Discussão	39
5. Conclusões	41
6. Referências Bibliográficas	42

RESUMO

Um recente relato da presença de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em polpa de tomate industrializada brasileira motivou preocupações quanto a possível presença de micotoxinas em produtos de tomate nacionais. *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são conhecidos produtores de aflatoxinas, uma família de toxinas com propriedades hepatotóxicas, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas.

No presente trabalho foi adaptado e avaliado um método para determinação de aflatoxinas em produtos de tomate por cromatografia de camada delgada com detecção por comparação visual com padrões. Para verificar a possível contaminação de produtos de tomate comercializados com aflatoxinas foram analisadas 63 amostras de produtos de tomate (polpa, extrato, purê, catchup, tomate desidratado e tomate seco conservado em óleo) provenientes de 5 Estados e uma do exterior, compreendendo 29 marcas. A avaliação do método para determinação das aflatoxinas em produtos de tomate resultou em uma recuperação média de 86%, para as quatro aflatoxinas, em dois níveis de adição. Os limites de detecção para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ variaram entre 2 e 7 µg/Kg dependendo do tipo de produto. As aflatoxinas não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas.

SUMMARY

A recent report on the presence of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in tomato pulp from a Brazilian plant caused concern about the possible presence of mycotoxins in tomato products from local plants. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* are known producers of aflatoxins, a group of toxins with hepatotoxic, mutagenic, teratogenic, and carcinogenic properties.

In the present work a thin layer chromatographic method with visual detection for the determination of aflatoxins in tomato products was adapted and evaluated. In order to verify a possible contamination of tomato products with aflatoxins, 63 samples of tomato products (pulp, paste, purée, catsup, dehydrated tomato and dried tomatoes in oil preserve) from 5 states and one from abroad, totaling 29 brands, were analyzed. The method evaluation showed an average recovery of 86%, for all four aflatoxins, at two levels of addition. The detection limits for the aflatoxins B₁, B₂, G₁ e G₂ ranged from 2 and 7 µg/Kg depending on the type of product. Aflatoxins were not detected in any of the samples analyzed.

1. INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, produzidos por fungos, quimicamente diversos e ocorrem em ampla variedade de substratos, incluindo alimentos e rações.

Os três principais gêneros de fungos produtores de micotoxinas são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Vários são os fatores que influenciam a produção de micotoxinas e incluem substrato, umidade, atividade de água, temperatura, pH e estresse (como o causado pela seca, pela temperatura inadequada para o fungo ou pela competição causada pelo crescimento simultâneo de outros fungos, leveduras ou bactérias no mesmo substrato).

A presença de micotoxinas em alimentos e rações é responsável por consideráveis perdas econômicas em criações de animais, seja por causar doenças, mortandade ou por reduzir seu desempenho, além de representar um risco à saúde humana.

Os fungos produtores de micotoxinas podem invadir os alimentos ou ração durante a produção, processamento, transporte ou armazenamento. A melhor forma para controlar a presença de micotoxinas em rações e alimentos é prevenir sua formação em etapas críticas como ainda no campo, durante o processamento, o transporte e o armazenamento.

Recentemente, o exame microbiológico de 15 lotes de polpa de tomate produzida em fábrica localizada no Estado de São Paulo, mostrou a presença de *Aspergillus flavus* em 6 lotes e *Aspergillus parasiticus* em 5 lotes. Algumas linhagens de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são conhecidas produtoras de aflatoxinas. As aflatoxinas constituem uma família de toxinas que

inspiram preocupação em órgãos de saúde em qualquer parte do mundo devido à sua ocorrência em alimentos importantes e suas propriedades hepatotóxicas, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas.

A ausência de dados sobre a incidência de aflatoxinas em produtos de tomate em termos internacionais, exceto por um trabalho desenvolvido na Itália, e a presença de fungos potencialmente produtores de aflatoxinas em polpa de tomate nacional sugeriu os objetivos do presente trabalho:

a) Adaptar e avaliar uma metodologia analítica para a determinação de aflatoxinas para produtos de tomate (tomate desidratado, tomate seco em conserva, purê de tomate, polpa de tomate, extrato de tomate e catchup).

b) Verificar a incidência de aflatoxinas em produtos de tomate (tomate desidratado, tomate seco em conserva, purê de tomate, polpa de tomate, extrato de tomate e catchup) comercializados nas cidades de Campinas-SP e São Paulo-SP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. AFLATOXINAS

As aflatoxinas (Figura 1) foram isoladas pela primeira vez diretamente de farelo de amendoim brasileiro, o qual era componente de uma ração que se mostrou letal para peruzinhos em fazendas inglesas nos anos 60 (Marasas e Nelson, 1987; Scott, 1991).

As aflatoxinas são produzidas pelo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (C.A.S.T., 1989) e pela rara espécie *Aspergillus nomius* (I.A.R.C., 1993).

Trata-se de uma família de compostos heterocíclicos altamente fluorescentes e oxigenados, caracterizados por moléculas de dihidrofurano ou tetrahydrofurano ligadas a uma molécula de cumarina substituída (Betina, 1985).

O *Aspergillus flavus* está distribuído mundialmente, porém, alguns fatores como umidade do substrato, umidade relativa do ar e temperatura ambiente, restringem as áreas nas quais a contaminação por aflatoxinas ocorre. A temperatura ótima para crescimento do *Aspergillus flavus* é 36°C a 38°C, mas a produção máxima de aflatoxinas ocorre de 25°C a 27°C (Marasas e Nelson, 1987) e a maioria das linhagens desta espécie não crescem abaixo de 13°C (Scott, 1991). Evidências indicam que 40% das linhagens de *Aspergillus flavus* isoladas da natureza são toxigênicas e que este produz somente as aflatoxinas B₁ e B₂. Já o *Aspergillus parasiticus* tem sido encontrado associado predominantemente com amendoim e produz as aflatoxinas tanto B como G. Praticamente todas as linhagens isoladas de *Aspergillus parasiticus* já testadas mostraram-se toxigênicas (Pitt e Tomaska, 2001).

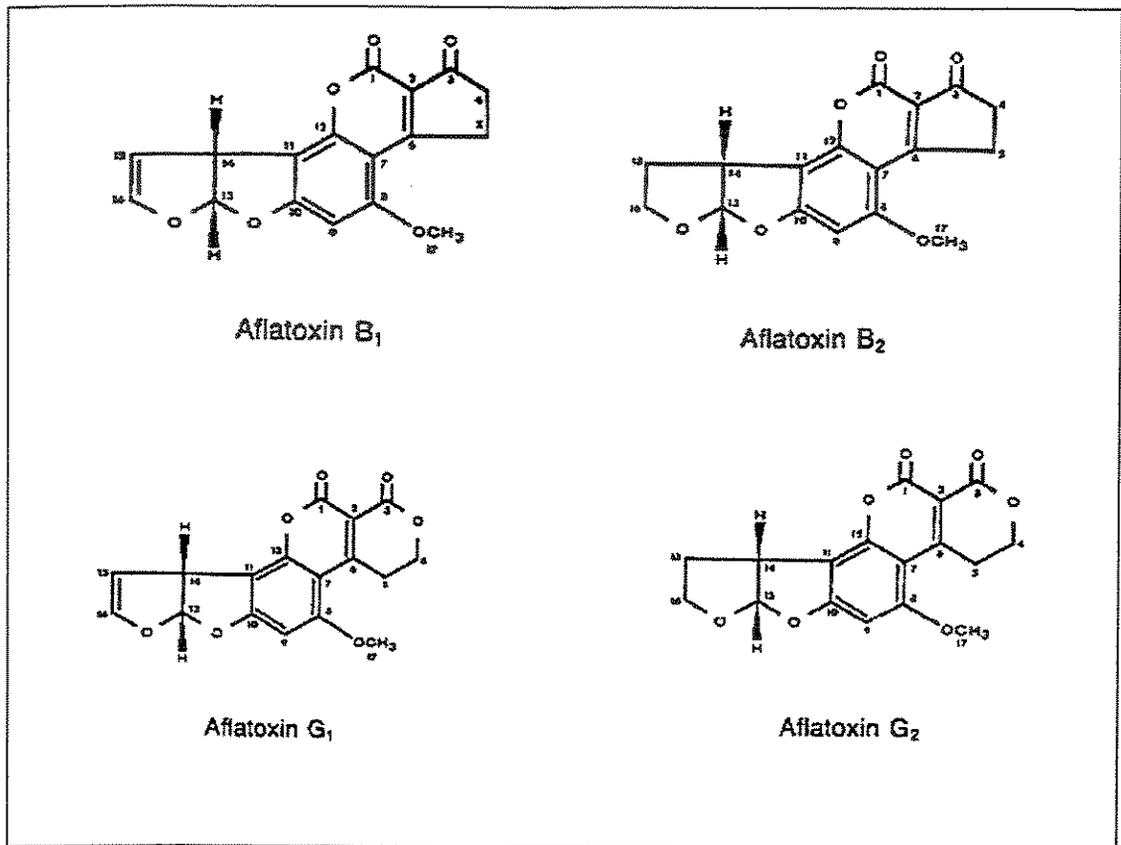


Figura 1. Estrutura química das aflatoxinas.

No estado seco, as aflatoxinas são estáveis até o ponto de fusão. Na presença de umidade, a destruição parcial ocorre quando temperaturas elevadas são mantidas por um longo período de tempo, como por exemplo, durante autoclavagem ou cozimento em forno (Marasas e Nelson, 1987). Essas toxinas são moderadamente estáveis durante processos de torração e, portanto são encontradas em produtos processados, como pasta de amendoim. Porém, a presença de aflatoxinas em óleos refinados é improvável. Apenas uma pequena porcentagem de aflatoxina B₁ presente nas sementes oleaginosas passa para o

óleo extraído ou prensado e as operações de refino e branqueamento a elimina (Scott, 1991).

De todas as micotoxinas atualmente conhecidas, as aflatoxinas são as que causam maior preocupação para saúde pública devido a sua ampla ocorrência em vários gêneros alimentícios (amendoim, leite e milho) e ao seu potencial como carcinógeno humano. As aflatoxinas são toxinas hepáticas potentes e seus efeitos em animais variam com a dose, tempo de exposição, espécie, raça, dieta e estado nutricional do indivíduo (C.A.S.T., 1989).

A contaminação de ração animal por micotoxinas pode resultar na passagem destas para os produtos comestíveis derivados do animal. A ocorrência da aflatoxina M₁, um metabólito da aflatoxina B₁, é a principal preocupação em leite e outros produtos lácteos, incluindo queijo (Scott, 1991).

Os principais estudos epidemiológicos enfocando as aflatoxinas foram conduzidos, primeiramente na Ásia e na África, e alguns têm mostrado associação positiva, enquanto outros têm indicado uma falta de associação positiva entre exposição a aflatoxinas e as doenças resultantes. A principal crítica de muitos destes estudos refere-se à hepatite B como um agente carcinogênico para células do fígado nas populações estudadas. Entretanto, a exata relação das aflatoxinas com o câncer nas células hepáticas não foi completamente estabelecida em humanos. De toda forma, em 1988, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) colocou a aflatoxina B₁ em sua lista de carcinógenos humanos (C.A.S.T., 1989).

Há evidências de que doenças humanas de etiologia desconhecida possam estar associadas a uma condição de aflatoxicose aguda ou crônica, dentre elas

citam-se cirrose infantil na Índia, síndrome de Reye, “Kwashiorkor” e carcinoma hepatocelular humano (Marasas e Nelson, 1987).

Os primeiros sinais clínicos, nos surtos de campo, de aflatoxicose aguda em gado, cães, aves e porcos, são inapetência, redução no ganho de peso e apatia generalizada. Em alguns animais ocorre evidência clínica de danos hepáticos, manifestada por icterícia, hemorragia e edema. A mortalidade é geralmente alta e pode ser precedida por sinais nervosos tais como ataxia e convulsões (Marasas e Nelson, 1987).

O consumo de baixos níveis de aflatoxinas por um longo período provavelmente constitui um problema veterinário muito mais sério que o agudo (Tabela 1). O principal impacto econômico da aflatoxicose é pouco visível e é manifestado principalmente como redução da eficiência alimentar e uma taxa de crescimento retardada. Animais afetados também podem estar predispostos a doenças infecciosas secundárias devido aos efeitos imunossupressores das aflatoxinas. As aflatoxinas também são um hepatocarcinógeno extremamente potente em algumas espécies animais, e o consumo de baixos níveis destas por um período longo pode resultar no desenvolvimento de câncer no fígado, por exemplo, em truta arco-íris (Marasas e Nelson, 1987).

Tabela 1 – Dose letal média para aflatoxina B₁ (Marasas e Nelson, 1987).

Espécie	DL ₅₀ *
Coelho	0,3
Pato	0,3
Gato	0,6
Porco	0,6
Truta	0,8
Cão	1,0
Porquinho da Índia	1,4
Ovelha	2,0
Macaco	2,2
Camundongo	9,0
Hamster	10,2
Pinto	11,5
Rato Macho	7,5
Rato Fêmea	17,9

* DL₅₀ = dose letal em mg de aflatoxina B₁ / Kg de peso corpóreo e administração via oral.

2.2. TOMATE E PRODUTOS DERIVADOS

O tomate é a hortaliça mais industrializada no Brasil e possivelmente no mundo, tendo grande valor tanto em termos de produção quanto econômico (Baglioni *et al.*, 1999).

De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no ano de 2.000 foram produzidas 3.073.000 toneladas de tomate que representam uma área colhida de 57.600 hectares (rendimento de cerca de

53.377Kg/ha) e as exportações atingiram 21.470 toneladas. A disponibilidade para consumo foi de 18,4Kg de tomate / habitante / ano (www.agricultura.gov.br).

Linhagens dos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Geotrichum*, e *Cladosporium* são os organismos invasores predominantes em tomates armazenados a 10-12°C ou a temperaturas amenas no verão. O microorganismo mais comum na deterioração de tomates é a *Alternaria* (Ayres *et al.*, 1964; Harwig, *et al.*, 1979; Mundt e Norman, 1982; Senter *et al.*, 1985). Sendo a *Alternaria* um dos organismos mais comuns responsáveis pelo apodrecimento de frutas e vegetais, a produção natural de micotoxinas nos suprimentos de alimentos pode constituir um perigo potencial para a saúde humana (Stinson *et al.*, 1981).

Em estudo realizado nos Estados Unidos (Mislivec *et al.*, 1987), foi determinada a microbiota fúngica em 146 amostras de tomates frescos visivelmente mofados coletados a partir de esteiras de seleção em plantas de processamento de catchup. Os fungos encontrados em 141 das amostras incluíram 22 gêneros, principalmente *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium*, e 51 espécies. No entanto, as espécies potencialmente toxigênicas *Aspergillus flavus* (aflatoxinas e ácido ciclopiazônico), *Penicillium cyclopium* (ácido ciclopiazônico e ácido penicílico) e *Penicillium viridicatum* (citrinina, ocratoxina A e xantomegnina) não foram detectadas.

No sudoeste da Nigéria, sete espécies de fungos associados com a podridão de tomates foram isoladas incluindo *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. Todos foram patogênicos para os frutos e menos podridão foi causada pela *Alternaria solani* (Oladiran e Iwu, 1993).

O tempo necessário para o desenvolvimento da deterioração em tomates está relacionado diretamente com a temperatura e umidade relativa do ar em todas as etapas da cadeia de comercialização. Se a temperatura na qual o tomate é mantido é muito baixa, ocorre dano pelo frio, aumentando a susceptibilidade para o apodrecimento. Quando a temperatura é muito alta, o apodrecimento é favorecido e a maturação da fruta leva a alterações indesejáveis de coloração. Em altas umidades relativas do ar, os fungos crescem rapidamente, enquanto a baixas umidades relativas do ar, a perda de peso do tomate é excessiva, resultando em murchamento (Ayres *et al.*, 1964).

A Resolução 12/78 CNNPA define alguns dos produtos de tomate mais comuns:

- Polpa de tomate concentrada: possui concentração entre 18° e 33°Brix (mais comum entre 22° e 26°Brix). A polpa é pasteurizada (90°C por 1 minuto) e a temperatura de concentração é entre 65° e 70°C.

- Extrato de tomate: possui um mínimo de 9%(p/p) de matéria seca menos cloreto de sódio. Pode conter até 5% de sal e 1% de açúcar.

- Purê de tomate: possui de 9% a 17,9% de sólidos e não pode conter açúcar.

- Catchup: é considerado um condimento preparado. Consiste num molho a base de polpa e suco de tomate acrescido de especiarias, sal e açúcar, contendo um mínimo de 35% de resíduo seco. É pasteurizado a 90°-95°C por 15 minutos.

2.3. A CONTAMINAÇÃO DE TOMATES POR FUNGOS

Minami e Fonseca (1982) nos descrevem as principais etapas de processamento de tomates e os pontos críticos para contaminação por fungos.

As principais fontes de contaminação fúngica nos produtos industrializados derivados de tomate são a seleção ineficiente que permita a passagem de tomates fungados para o processo ou que não remova as partes afetadas, e a contaminação dos equipamentos da planta de processamento.

A contaminação do tomate por fungos do gênero *Aspergillus* tem origem no solo onde fungos deste gênero são facilmente encontrados. A contaminação dá-se durante o desenvolvimento do fruto através do contato com partículas de solo e torna-se mais efetiva durante o período das chuvas devido à facilidade dos respingos de água com partículas de solo aderirem aos frutos.

O acondicionamento do tomate para transporte é feito em caixas plásticas ou de madeira que são geralmente carregadas com quantidades que excedem a sua capacidade. Com o empilhamento, os tomates das camadas inferiores são amassados e rompidos provocando não só escoamento do suco como também a fermentação parcial dos frutos. Além das perdas que ocorrem, a situação propicia uma maior contaminação fúngica e bacteriana da matéria prima e das caixas. Portanto, as caixas usadas para transporte podem tornar-se foco de contaminação dos tomates da remessa seguinte. A medida preventiva indicada é lavá-las sempre com água fortemente clorada ou com jatos de água fervendo ou vapor.

A espera na recepção, para descarregamento na indústria processadora, pode demorar longas horas, onde os tomates ficam expostos a altas temperaturas (conforme a época do ano) acelerando seu metabolismo e com isso provocando

uma diminuição na consistência do fruto, que por sua vez irá refletir na qualidade do produto final.

Os tomates ao chegarem à planta de processamento ou são descarregados diretamente na linha de produção ou, mais comumente, são armazenados nas próprias caixas.

A pré-lavagem e a lavagem são algumas das operações mais importantes neste tipo de processamento. A maioria dos tomates destinados à indústria é cultivada sem estaqueamento, ou seja, os frutos ficam em contato ou próximos do solo possibilitando uma grande contaminação, além de carregarem partículas de solo quando coletados. É de suma importância o uso de água clorada nesta etapa do processo. O monitoramento da dosagem de cloro livre na água de lavagem é um importante ponto de controle no processo.

A etapa de seleção consiste na remoção dos frutos verdes e defeituosos ou de parte defeituosas dos frutos (áreas deterioradas, tecidos necrosados, marcas de ataques por insetos, etc.). A não retirada das partes atacadas por fungos acarretará em um produto final de qualidade inferior. Há uma estreita relação entre frutos estragados e o teor de hifas de fungos no produto final. Cerca de 1% de tomates alterados já é suficiente para dar, no exame microscópico de Howard, um percentual de campos positivos (de fungos) não inferior a 60%. Isto ocorre porque o processamento divide a massa de hifas e a espalha durante o processamento. Recomenda-se a rotação dos funcionários na atividade de inspeção (vista cansada) e higienização periódica da esteira de seleção para eliminação de fungos.

O preparo de concentrados de tomate consiste na eliminação de uma parte da água do suco obtido pela trituração do tomate e extração e refinação do triturado. A prática da concentração, como técnica de conservação do tomate, justifica-se pela maior estabilidade à deterioração microbiana alcançada pela redução da atividade de água e pela diminuição dos custos de elaboração, armazenamento e transporte decorrentes da grande redução de peso e volume.

2.4. ÍNDICE DE HOWARD

Um dos indicadores da qualidade microbiológica dos produtos de tomate é sua contagem de fungos ou Índice de Howard. Embora a presença de fungos não seja necessariamente um problema de saúde pública, sua quantidade em um produto é indicativa da qualidade da matéria prima e das práticas de higiene na planta de processamento. Pode também ser útil para apontar falhas na manipulação da matéria prima, como por exemplo, no transporte, armazenamento ou seleção (Lendvai *et al*, 1976; Goulart e Carvalho, 1983).

A contagem de fungos pelo Método Howard não faz distinção entre as espécies presentes no produto, sendo baseada nas características mais comuns a todos os fungos freqüentemente encontrados nos produtos de tomate (Minami e Fonseca, 1982).

Em estudo realizado em Florianópolis – SC por Goulart e Carvalho (1983), foram analisadas 405 unidades amostrais de produtos derivados de tomate provenientes do comércio local através do Método de Howard. A porcentagem de amostras com o limite de campos positivos acima do permitido pela legislação brasileira (40%) foi de 71,6%, ou seja, 290 amostras.

Apesar do grande desenvolvimento e da importância da indústria de produtos derivados de tomate, os produtos por ela obtidos freqüentemente ainda são de baixa qualidade, resultado este, em grande parte, devido à qualidade pobre da matéria prima e das condições sanitárias do processamento.

Nos Estados Unidos, a regulamentação limita o índice de Howard em 20% para suco de tomate e 40% para catchup, purê e extrato (Basker *et al.*, 1977). A legislação brasileira tolera no máximo 40% de campos positivos com filamentos de fungos em extrato e purê de tomate (Resolução 12/78 CNNPA).

2.5. INCIDÊNCIA DE MICOTOXINAS EM PRODUTOS DE TOMATE A NÍVEL MUNDIAL

Em estudo realizado por Scott e Kanhere (1980), 8 amostras de 6 diferentes marcas de extrato de tomate disponíveis comercialmente nos Estados Unidos apresentaram traços (0,1µg/Kg ou menos) de ácido tenuazônico, produzido por espécies do gênero *Alternaria*. O ácido tenuazônico foi detectado em tomates visivelmente mofados coletados em linhas de processamento de vários fabricantes de catchup nos Estados Unidos. Stack *et al.* (1985) analisaram 142 amostras de catchup, sendo que 73 estavam contaminadas com ácido tenuazônico em concentrações entre 0,4µg/Kg e 70,0µg/Kg. Resultado semelhante foi encontrado por Mislivec *et al.* (1987) que, dentre 146 amostras analisadas, verificaram 73 contaminadas com ácido tenuazônico, em níveis de 0,4µg/Kg a 69,7µg/Kg.

Tomates inoculados com linhagens de *Alternaria* foram capazes de produzir em laboratório ácido tenuazônico, alternariol, alternariol metil éter e altenueno (Harwig *et al.*, 1979; Stinson *et al.*, 1980). Ozcelik *et al.* (1990), no entanto, não

detectaram ácido tenuazônico em tomates inoculados com *Alternaria alternata*, independente da temperatura de armazenamento ou tipo de embalagem, contrariando publicações anteriores que relataram que quantidades substanciais de ácido tenuazônico foram produzidas por espécies de *Alternaria* em tomates.

Patulina não foi encontrada em 23 amostras de extrato de tomate analisadas na Alemanha (Acar e Klaushofer, 1984).

Até o presente, apenas na Itália foram realizadas pesquisas sobre a ocorrência de aflatoxinas em produtos de tomate. Em um levantamento realizado por um laboratório de Saúde Pública de Roma, onde foram analisadas 14 amostras de tomate em conserva e 14 amostras de extrato de tomate não foram encontradas aflatoxinas em nenhuma amostra (limite de detecção do método 1µg/Kg). Nas mesmas amostras também não se detectou patulina e ocratoxina (Gelosa, 1983). Também não foram detectadas aflatoxinas em outras 70 amostras de produtos de tomate (40 de suco de tomate, 20 de extrato de tomate 28% de sólidos, e 10 de extrato de tomate 36% de sólidos) igualmente analisadas (Mutti *et al.*, 1992 a). No entanto, Lucisano *et al* (1972) inocularam a linhagem de *Aspergillus flavus* (NRRL A-16100) em suco de tomate e obtiveram uma concentração de 12 µg/g de aflatoxinas e Mutti *et al.* (1992 a) inocularam a linhagem de *Aspergillus parasiticus* (NRRL2999) , comprovadamente toxigênica, em 3 substratos diferentes: suco de tomate, extrato de tomate com 28% de sólidos e extrato de tomate com 36% de sólidos, obtendo uma concentração máxima para as aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂ de 380 µg/Kg, 164 µg/Kg e 33 µg/Kg, respectivamente, após 20 dias de incubação a 25°C.

2.6. INCIDÊNCIA DE MICOTOXINAS EM PRODUTOS DE TOMATE A NÍVEL NACIONAL

No Brasil, 80 amostras de produtos de tomate foram analisadas para ácido tenuazônico, ácido ciclopiazônico, alternariol e alternariol monometil éter (11 de sucos, 22 de polpas, 22 de purês, 24 de extratos e 1 de tomates inteiros em conserva). O ácido tenuazônico foi encontrado em 7 amostras de polpa de tomate (39 -111 ng/g) e 4 amostras de purê de tomate (29 -76 ng/g). O ácido ciclopiazônico foi encontrado em 6 amostras de polpa (64 -178 ng/g) e 2 amostras de purê (36-117 ng/g). A co-ocorrência de ácido tenuazônico e ciclopiazônico foi observada em 2 amostras de purê e uma de polpa. O alternariol e o alternariol monometil éter não foram detectados em nenhuma das amostras (Motta e Valente Soares, 2001).

Kawashima *et al* (2002) não detectaram a presença de patulina e verruculógeno em 84 amostras de polpa de tomate provenientes de 2 indústrias brasileiras processadoras de tomate.

Recentemente, o exame microbiológico de 15 lotes de polpa de tomate produzida em uma indústria localizada no Estado de São Paulo, mostrou a presença de *Aspergillus flavus* em 6 dos lotes e *Aspergillus parasiticus* em 5 dos lotes (Massaguer, P.R., dados não publicados), indicando a possibilidade da presença de aflatoxinas em produtos de tomate e a necessidade de uma investigação sobre este perigo potencial.

2.7. AÇÃO DE COMPOSTOS INIBIDORES NA SÍNTESE DE AFLATOXINAS

Os flavonóides são um grupo de metabólitos secundários, geralmente pigmentos, que ocorrem somente em uma ampla variedade de produtos vegetais. Eles possuem uma estrutura $-C_6-C_3-C_6-$ sendo que as duas partes da molécula com seis carbonos são anéis aromáticos (Bobbio e Bobbio, 1992; Mallozzi *et al*, 1996). Estes compostos formam uma barreira química contra microorganismos invasores e, portanto, têm sido considerados como uma possível alternativa no controle de fungos em grãos armazenados.

Mallozzi *et al* (1996) realizaram um trabalho com quatro flavonóides (kampferol, naringinina, quercetina e kampferitrina) no crescimento de *Aspergillus flavus* e na produção de aflatoxina B₁. Obtiveram inibição de crescimento entre 36% (quercetina) e 60,5% (naringinina), e a inibição máxima de 99% para produção de aflatoxina B₁ na presença de kampferitrina na concentração de 100 ppm.

Na Espanha, nove variedades comerciais de tomates foram avaliadas para o seu teor de licopeno e compostos fenólicos que foram caracterizados como flavonóides (quercetina, kampferol e naringinina) e ácidos hidroxicinâmicos (ácidos caféico, clorogênico, ferúlico e p-cumárico). A quercetina foi o flavonóide encontrado em concentrações mais elevadas, entre 7,19 e 43,59 mg/Kg (Martínez-Valverde *et al*, 2002).

Na França, Fleuriet (1976), estudou de uma forma semiquantitativa a variação nos teores de compostos fenólicos não flavonóides no crescimento e maturação de tomates cereja. Observou que os compostos, ácido clorogênico,

rutina, p-cumarilglucose, ácido p-cumarilquínico, e derivados não identificados do ácido cumárico e do ácido sinápico, diminuem em concentração com o decorrer da maturação do fruto.

Hua *et al* (1999) verificaram que os compostos fenólicos acetosiringona, siringaldeído e ácido sinapínico são capazes de inibir a biossíntese de aflatoxina B₁ pelo *Aspergillus flavus*.

2.8. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM ALIMENTOS

Em 1979, o banco de dados do “US Food and Drug Administration” continha mais de 1300 métodos analíticos para micotoxinas, 38% destes referiam-se as aflatoxinas (Scott, 1991). O estudo de novos métodos continua e, atualmente, métodos estudados colaborativamente, aceitos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC Internacional) e referendados pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) estão disponíveis para aflatoxinas (incluindo aflatoxina M₁), ocratoxina A, esterigmatocistina, patulina, zearalenona, tricotecenos e fumonisinas (AOAC Int., 1998). Os métodos para toxinas de *Alternaria*, citrinina, ácido ciclopiazônico, alcalóides do ergot e tricotecenos em geral, são atualmente objeto de estudo pela AOAC (Scott, 1995).

Após os procedimentos de amostragem e preparo da amostra, um método analítico é geralmente composto de extração, limpeza, prova qualitativa (ou teste de triagem), determinação quantitativa e passos confirmatórios (Scott, 1991).

2.8.1. EXTRAÇÃO E LIMPEZA

As micotoxinas são extraídas de alimentos através da mistura ou agitação da amostra com solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, acetato de etila, acetona, clorofórmio e diclorometano, geralmente junto com água e algumas vezes em presença de ácidos (para ocratoxina A) ou em pH alcalino (para alcalóides do ergot) (Scott, 1991; Betina, 1985). Os principais procedimentos para limpeza dos extratos de amostras são partição líquido-líquido, adição de sais metálicos (técnicas de precipitação), extração em fase sólida, cromatografia em coluna, cromatografia de permeação em gel, cromatografia em coluna de imunoafinidade, e uso de colunas de limpeza multi-funcionais (Betina, 1985; Gilbert, 1993; Scott, 1995). Nestes procedimentos, co-extrativos como lipídios, ácidos graxos, proteínas e pigmentos são removidos dos extratos das amostras de alimentos. O desengorduramento pode ser realizado com hexano ou isooctano. Outra forma seria a aplicação do extrato bruto em uma placa de cromatografia de camada delgada (CCD) e seu desenvolvimento em benzeno-hexano (3:1, v/v). No último caso, muitos dos contaminantes movem-se com a frente de solvente, enquanto as micotoxinas permanecem na base, sendo desenvolvidas usando outro sistema de solvente (Betina, 1985; Scott, 1991).

2.8.2. DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO

2.8.2.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O passo de detecção e quantificação na determinação de micotoxinas tem classicamente sido a CCD usando determinação visual ou densitométrica. A CCD

é uma técnica simples que geralmente é realizada em uma dimensão em uma camada de sílica gel com desenvolvimento único em solvente ou sistema de solventes. Porém, quando é necessária uma melhor separação, a CCD bidimensional é uma técnica mais poderosa, porém com a desvantagem de somente poder ser utilizada para uma amostra de cada vez (Scott, 1991; Scott, 1995).

O adsorvente mais comumente utilizado para micotoxinas é a sílica gel. A espessura da camada é freqüentemente de 0,1 mm a 0,3 mm para uso analíticos e 0,5 mm a 2,0 mm para uso preparativo (Betina, 1985). Os sistemas de solventes utilizados para desenvolvimento, inicialmente, consistiram de diversas proporções de metanol em clorofórmio. Posteriormente, a acetona substituiu o metanol devido a grande sensibilidade do sistema clorofórmio-metanol à umidade e outras alterações ambientais (Betina, 1985).

2.8.2.2. CROMATOGRAFIA EM COLUNA

As técnicas de cromatografia líquida em coluna são usadas na área de micotoxinas com três objetivos principais: limpeza dos extratos contendo micotoxinas para determinações posteriores por outros métodos, separações e purificações em larga escala e determinações qualitativas ou quantitativas de micotoxinas (Betina, 1989).

2.8.2.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Em geral, não existem diferenças significativas na exatidão e na precisão entre laboratórios utilizando CLAE e aqueles usando CCD para a determinação de aflatoxinas, porém, até o final da década de 80 ocorreu um aumento na pesquisa e aplicação de CLAE que apresentou como vantagens um aumento na sensibilidade, precisão e potencial para automação (Scott, 1991).

A CLAE para a determinação de aflatoxinas pode ser realizada sob condições de fase normal ou reversa com detecção por absorção ultravioleta (UV) ou fluorescência. Para CLAE fase reversa, é necessária a derivação das aflatoxinas B₁ e G₁ para se medir a fluorescência destas (Scott, 1991).

A fluorimetria é a técnica de detecção mais comumente usada para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ devido a sua fluorescência nativa apresentando λ_{ex} = 360nm para as quatro aflatoxinas e λ_{em} = 440nm para B₁ e B₂ e 470nm para G₁ e G₂ (Betina, 1989).

Embora a detecção por fluorescência seja o meio preferido para monitoramento de aflatoxinas por CLAE, a fluorescência das aflatoxinas B₁ e G₁ é dependente do solvente, e esta pode ser suprimida em certos eluentes importantes empregados na CLAE. Este problema foi solucionado através da utilização de uma derivação pré-coluna. Derivados hemiacetal das aflatoxinas são obtidos pela reação com ácido trifluoroacético (TFA). No entanto, estes derivados são sensíveis a traços de metanol, e possuem baixa estabilidade em longo prazo como, por exemplo, quando deixados por longos períodos em um amostrador automático (Gilbert, 1993).

2.8.2.4. CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

Historicamente, a cromatografia gasosa foi introduzida no campo das micotoxinas no início dos anos 70.

A cromatografia gasosa pode ser utilizada para a determinação de micotoxinas se estas forem suficientemente voláteis à temperatura da coluna, ou se as toxinas hidroxiladas puderem ser convertidas em derivados voláteis (Betina, 1989). As micotoxinas não são voláteis e a derivação é quase sempre necessária para sua determinação por cromatografia a gás (Scott, 1991; Scott, 1995). Relatos recentes têm descrito métodos para sua determinação por cromatografia gasosa – espectrometria de massas (CG-EM) para esterigmatocistina em grãos, zearalenona em flocos de milho, ácido tenuazônico em polpa de tomate, patulina em suco de maçã e para confirmação de aflatoxinas B₁ e B₂ em extratos de amendoim (Scott, 1991).

2.8.2.5. IMUNOENSAIOS

ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay) é a base de diversos “kits” de testes comerciais. Eles são específicos, sensíveis, rápidos e fáceis de usar assim como a limpeza do extrato, se necessária, é mínima (Scott, 1995).

Imunoensaio é uma técnica importante para a detecção de micotoxinas. Depende da interação de uma dada micotoxina com um anticorpo específico obtido a partir de um animal de laboratório. O animal, como um coelho, por exemplo, é previamente inoculado com um conjugado micotoxina-proteína provocando a produção de anticorpos, os quais são isolados para preparação do imunoensaio. O tipo ELISA competitivo é utilizado na determinação de

micotoxinas. O teste pode ainda usar um dos dois sistemas seguintes: (a) competição direta de anticorpos específicos e incubação da amostra com um conjugado micotoxina-enzima e (b) competição indireta, onde um conjugado micotoxina-proteína (ou polipeptídio) é colocado nas células de uma placa na qual a amostra é incubada com o anticorpo específico (Scott, 1991).

Mutti *et al* (1992 b) avaliaram quatro kits imunológicos disponíveis no mercado para determinação de aflatoxinas totais ($B_1+B_2+G_1+G_2$) em produtos de tomate. As amostras analisadas foram suco de tomate (8% de sólidos) e extrato (28% e 36% de sólidos) artificialmente contaminados com uma mistura de aflatoxinas na faixa de 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. O limite de detecção encontrado foi de 10 μg de aflatoxinas / Kg de produto de tomate.

3. ADAPTAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DAS AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ E G₂ EM PRODUTOS DE TOMATE.

O método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (1989) para determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por cromatografia em camada delgada em cereais e leguminosas foi testado, adaptado e avaliado para produtos de tomate.

3.1. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1. REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS DIVERSOS

- Padrões: aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, marca Sigma, dissolvidas em benzeno.
- Solventes para extração: metanol p.a., cloreto de potássio p.a. e clorofórmio p.a.
- Agentes clarificantes: solução de sulfato de amônio 30%, terra diatomácea (Celite, Lompoc, Califórnia, EUA).
- Fase móvel: clorofórmio-acetona (9:1, v/v).
- Cromatofolhas de sílica gel (Merk 20x20) sem indicador.
- Cuba cromatográfica, marca Desaga, Alemanha.
- Vidraria comum de laboratório.
- Papel de filtro qualitativo.

3.1.2. EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro ultravioleta / visível para determinar a concentração dos padrões de aflatoxinas. Modelo Lambda 6, Perkin Elmer, EUA.
- Banho-maria, modelo 100, Marca Fanem, Brasil.
- Liquidificador doméstico.
- Lâmpada U.V., multibanda 254/366nm, modelo UVGL 58, marca UVP, San Gabriel, Califórnia, EUA.
- Micropipetadores digitais com volumes reguláveis 100-1000 μ L e 10-100 μ L, Marca Finnpiette, Finlândia.
- Microseringa de 10 μ L, marca Hamilton, EUA.
- Banho ultra-som, SX-20, marca Microsonic, EUA.

3.1.3. PADRÕES

Os padrões das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram obtidos da Sigma Chemical Co. (EUA) e preparados de acordo com o descrito no método 970.44, Official Methods of Analysis, AOAC International (1998).

3.1.4. CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DAS AMOSTRAS DE PRODUTOS DE TOMATE

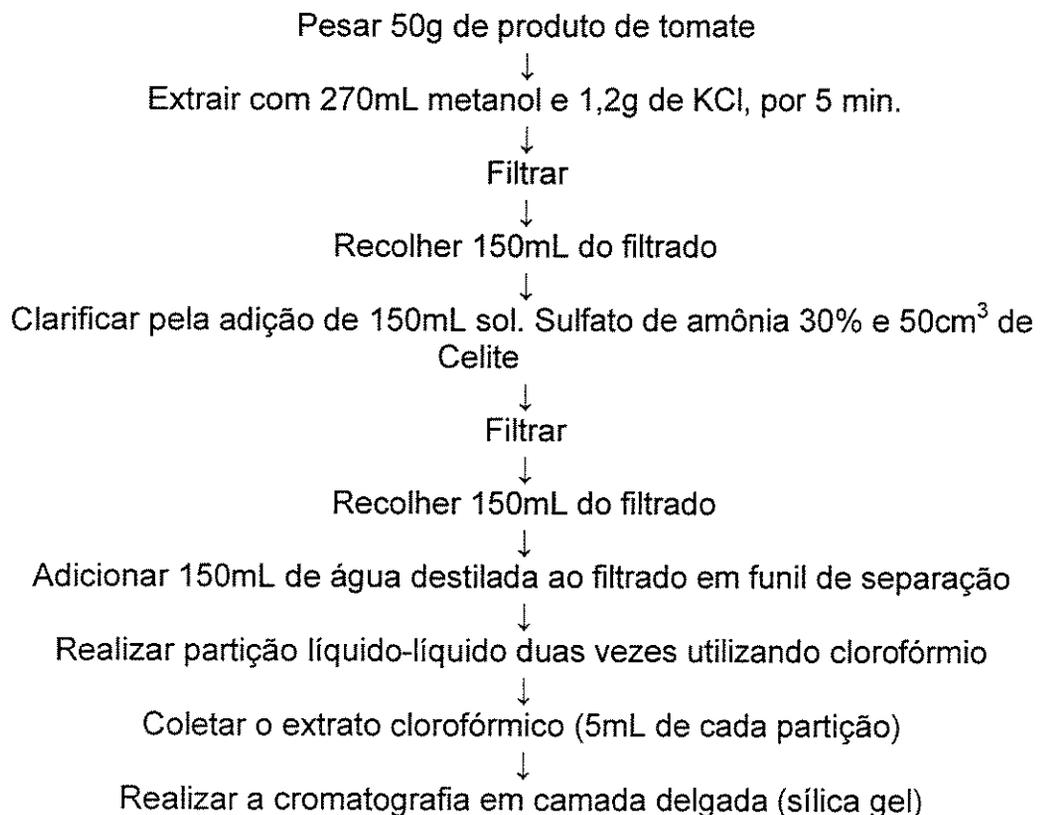
As amostras foram artificialmente contaminadas pela adição de quantidades definidas de cada padrão com uma pipeta automática, seguida de

homogeneização manual para distribuição da toxina na amostra. As determinações foram realizadas em duplicata para cada matriz em cada nível de adição.

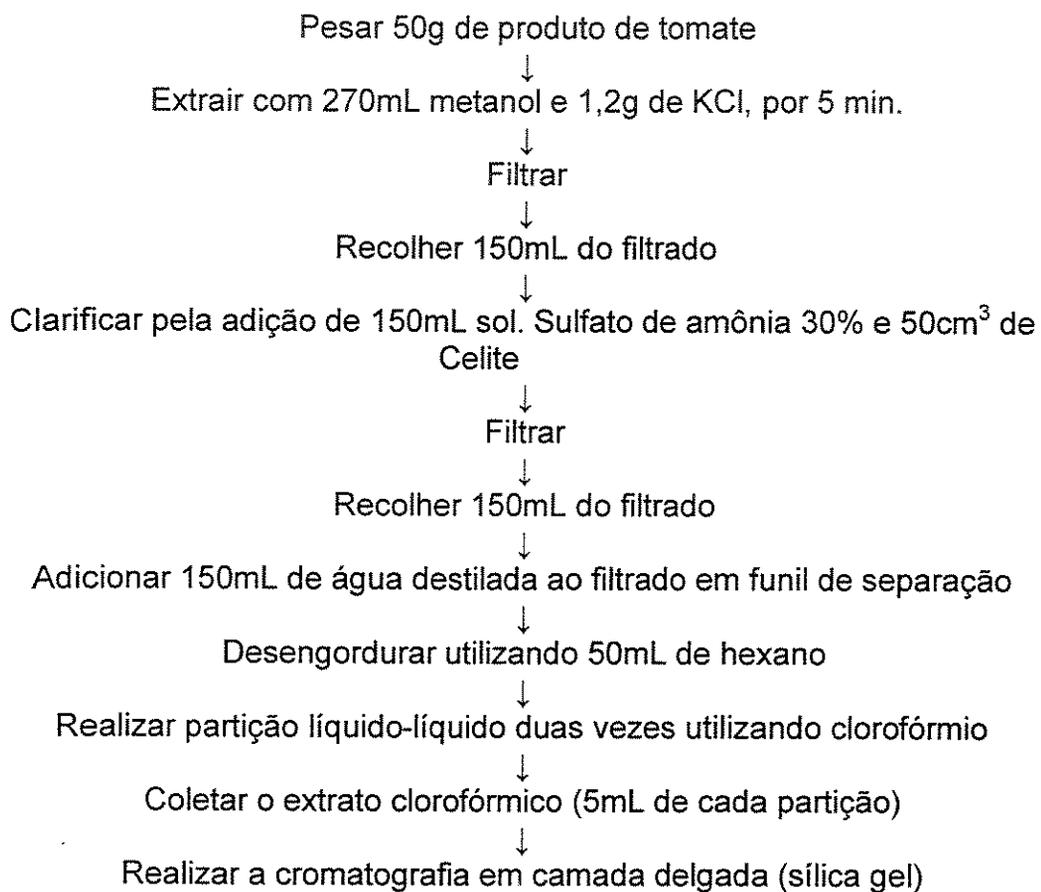
3.1.5. ADAPTAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A seguir estão apresentados, como fluxogramas, os quatro procedimentos testados para se chegar à adaptação do método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (1989) para determinação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ para produtos de tomate. As modificações realizadas foram introduzidas devido ao alto teor de água nos produtos de tomate.

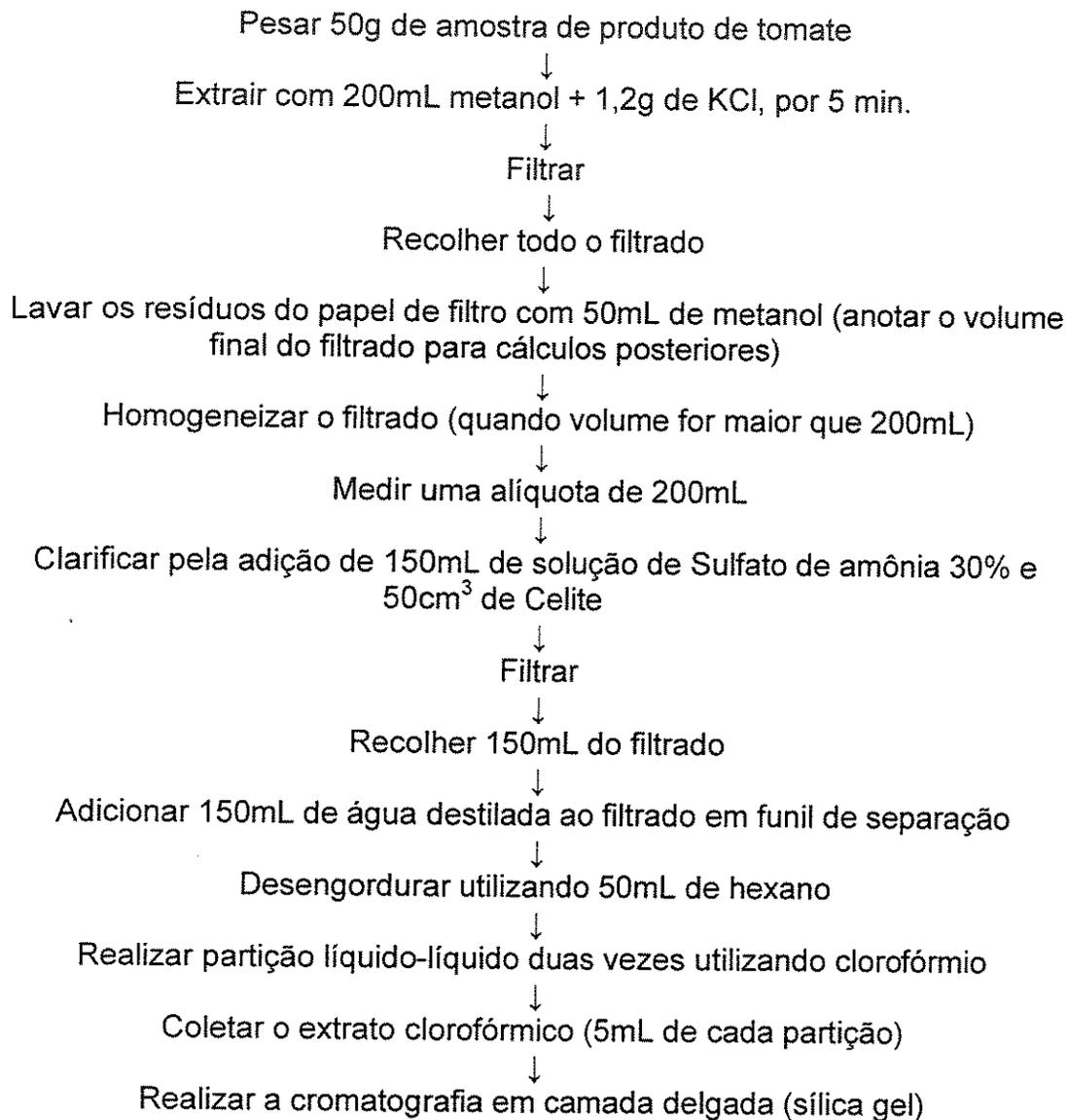
Procedimento 1



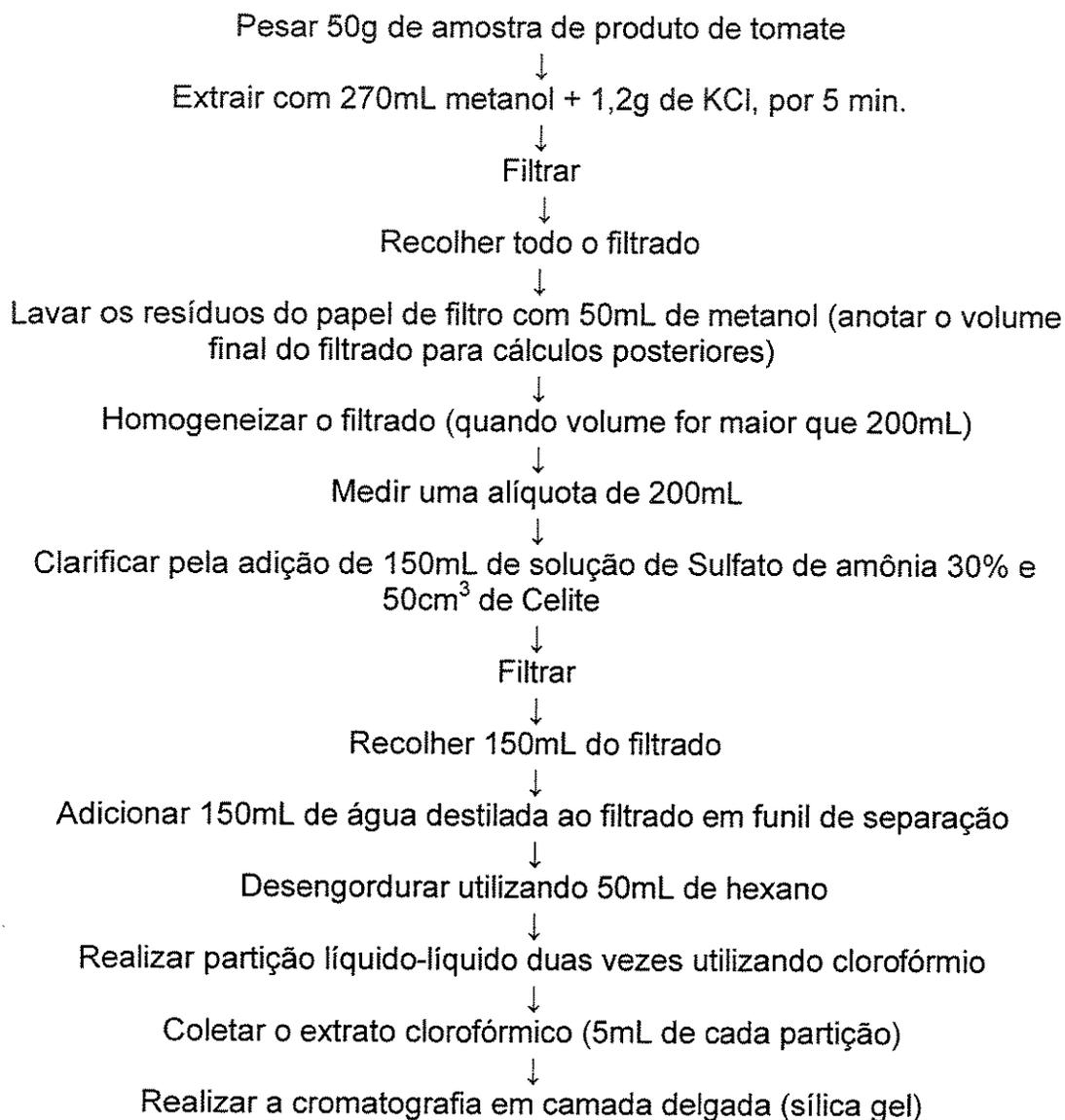
Procedimento 2



Procedimento 3



Procedimento 4



3.1.6. AVALIAÇÃO DO MÉTODO MODIFICADO

A recuperação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em produtos de tomate pelo método modificado foi avaliada adicionando as toxinas ao mesmo tipo de produto que estava sendo analisado. Desta maneira o método foi avaliado para

recuperação ao mesmo tempo em que um controle de qualidade das análises de produtos de tomate foi realizado.

Os limites de detecção para o método modificado foram estabelecidos utilizando-se o extrato de cada um dos tipos de produtos de tomate avaliados. 10µL do extrato foram aplicados em vários pontos na placa para cromatografia em camada delgada e sobre estes foram aplicados volumes diferentes das soluções padrão das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ correspondente a concentrações que variaram de cerca de 2µg/Kg de amostra a cerca de 20µg/Kg de amostra. Após desenvolvimento das placas em clorofórmio:acetona (9:1, v/v) foi considerado como limite de detecção a concentração abaixo da qual as aflatoxinas já não eram mais visíveis a olho nu sob luz ultravioleta.

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto aos procedimentos 1 e 2, verificou-se que após o desenvolvimento cromatográfico, os interferentes da amostra localizaram-se em R_fs (razão entre a distância percorrida pela substância teste e a distância percorrida pela frente da fase móvel) menores que os das aflatoxinas não interferindo na análise. Portanto, o desengorduramento da amostra não contribuiu para aprimorar a limpeza da amostra.

Nos testes de recuperação, com uma contaminação artificial de 5,07 ng de aflatoxina B₁ / g de amostra; 4,30 ng de aflatoxina B₂ / g de amostra; 6,08 ng de aflatoxina G₁ / g de amostra e 4,43 ng de aflatoxina G₂ / g de amostra observou-se a mesma taxa de recuperação para os procedimentos com e sem

desengorduramento com hexano (95,98%). Optou-se então pelo uso do procedimento 2 para continuação dos testes.

Então foram diminuídas as quantidades de toxina adicionadas para extração (3,38 ng aflatoxina B₁ / g de amostra; 2,86 ng aflatoxina B₂ / g de amostra; 4,05 ng aflatoxina G₁ / g de amostra e 2,96 ng aflatoxina G₂ / g de amostra) e obteve-se uma série de resultados com recuperação acima de 100%. Foram então realizadas alterações referentes ao volume de metanol empregado na extração, ao volume de filtrado colhido e lavagem de material na filtração (Procedimento 3).

O mesmo ocorreu quando foi adicionada uma enzima (Citrazym ultras, em diluição 1:10000) para facilitar a extração das toxinas. As amostras que foram hidrolisadas por 10 minutos antes da extração com metanol:KCl não apresentaram diferenças na cromatografia, apenas ficaram menos viscosas na transferência da amostra do béquer para o copo do liquidificador.

Após a alteração descrita no procedimento 3, obteve-se alguns resultados de recuperação abaixo de 76% indicando que o volume de solvente (metanol) utilizado não era suficiente para a extração completa das aflatoxinas. Desse modo foi realizada uma nova alteração na metodologia (Procedimento 4) com aumento no volume do solvente de extração para realizar a extração do conteúdo total de aflatoxinas da amostra.

Os resultados obtidos para recuperação e limites de detecção empregando-se o procedimento 4 (Tabelas 2 e 3) o indicaram como adequado para ser usado para produtos de tomate. O método é o descrito por Soares e Rodriguez-Amaya

(1989) com as modificações descritas a seguir e que foram introduzidas devido ao elevado teor de água nos produtos de tomate:

Cinquenta gramas de amostra foram extraídos com 270mL metanol e 1,2g KCl em um liquidificador por 5 minutos em velocidade baixa. No caso de tomates desidratados e de tomates secos conservados em óleo, foram usados 30mL de solução 4% KCl em vez de 1,2g KCl. O extrato resultante foi filtrado através de um papel de filtro qualitativo frizado e o filtrado recolhido em uma proveta. O resíduo presente no papel de filtro foi lavado com 50mL de metanol e o filtrado recolhido na mesma proveta. O volume obtido foi registrado para os cálculos posteriores. Os tomates secos e os tomates secos conservados em óleo não foram lavados com metanol.

Uma alíquota de 200 mL do filtrado (150mL no caso de tomates secos e de tomates secos conservados em óleo) foi recolhida e clarificada com 150mL de uma solução de 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 50 cm³ de terra diatomácea (Celite). Após agitação com um bastão de vidro a mistura foi filtrada através de papel qualitativo frizado. Uma alíquota de 150 mL foi transferida para um funil de separação. Ao funil de separação foram adicionados 150 mL de água e 10 mL de clorofórmio. Após agitação suave e inversões sucessivas do funil por 3 minutos as fases foram deixadas em repouso para haver uma separação e a fase do clorofórmio foi drenada. Desta primeira separação 5 mL da fase do clorofórmio foi reservado em bquer de tamanho apropriado. Uma segunda partição foi realizada com 10 mL de clorofórmio e outra alíquota de 5 mL foi recolhida e adicionada à primeira. Os extratos clorofórmicos reunidos foram levados à secura em um banho Maria a 60°C sob uma corrente de nitrogênio. O resíduo foi suspenso em

200 μ L benzeno e agitado em ultra-som por 30 segundos para assegurar completa dissolução. Em uma placa de sílica-gel de 0,25 mm para cromatografia em camada delgada (Merck) foram aplicados os padrões quantitativos das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (Sigma) e os extratos das amostras. A placa foi desenvolvida em uma cuba não-saturada com clorofórmio-acetona (9:1, v/v). Após desenvolvimento as manchas foram comparadas sob luz ultravioleta 366 nm.

Tabela 2 – Recuperação (%) das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ pelo método Soares e Rodriguez-Amaya (1989) modificado para produtos de tomate.

Produto	Nível de adição I *				Nível de adição II **			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
catchup	84	84	84	84	84	84	84	84
	84	84	84	84	93	93	93	93
Polpa	79	79	79	79	94	94	94	94
	87	87	87	87	97	97	97	97
Pasta	75	75	75	75	84	84	84	84
	77	77	77	77	92	92	92	92
Purê	94	94	94	94	91	91	91	91
	82	82	82	82	99	99	97	99
Tomate desidratado	79	79	79	79	96	96	96	96
	83	83	83	83	85	85	85	85
Tomate seco em óleo	88	88	88	88	79	79	79	79
	80	80	80	80	80	80	80	80

Recuperação total média (%): B₁ = 86; B₂ = 86; G₁ = 86; G₂ = 86

*Nível de adição I - Aflatoxina B₁ – 6,76 µg/Kg; Aflatoxina B₂ – 5,73 µg/Kg; Aflatoxina G₁ – 8,10 µg/Kg e Aflatoxina G₂ – 5,91 µg/Kg.

**Nível de adição II - Aflatoxina B₁ – 16,91 µg/Kg; Aflatoxina B₂ – 14,33 µg/Kg; Aflatoxina G₁ – 20,27 µg/Kg e Aflatoxina G₂ – 14,78 µg/Kg.

Tabela 3 – Limites de detecção ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) para o método Soares e Rodriguez Amaya (1989) modificado para aplicação em produtos de tomate.

AMOSTRA	B₁	B₂	G₁	G₂	Total
Tomate Desidratado	5,5	4,6	6,6	4,8	21,5
Tomate Seco em Conserva	2,7	2,3	3,2	2,4	10,6
Catchup	1,8	1,5	2,2	1,6	7,1
Extrato	1,7	1,5	2,1	1,5	6,8
Purê	2,0	1,7	2,4	1,7	7,8
Polpa	2,0	1,7	2,4	1,8	7,9

4. LEVANTAMENTO DA INCIDÊNCIA DE AFLATOXINAS EM PRODUTOS DE TOMATE COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DE CAMPINAS E SÃO PAULO.

4.1. INTRODUÇÃO

Um recente relato da presença de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em polpa de tomate industrializada brasileira motivou preocupações quanto a possível presença de aflatoxinas em produtos de tomate nacionais. Sendo assim, após adaptação e avaliação de metodologia analítica para detecção de aflatoxinas em produtos de tomate foi realizada a avaliação da incidência destas em produtos comercializados nas cidades de São Paulo-SP e Campinas-SP.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. AMOSTRAS

Amostras de produtos de tomate, em embalagens de metal, vidro e papelão (7 de purê, 14 de polpa, 15 de extrato, 15 de catchup, 4 de tomate desidratado e 8 de tomate seco em conserva de óleo) foram adquiridos em lojas e mercados durante o período de março a novembro de 2001, nas cidades de Campinas e São Paulo, Estado de São Paulo.

As amostras (Tabela 4) foram mantidas à temperatura ambiente nas suas embalagens originais até realização das análises quando a embalagem foi aberta e homogeneizada manualmente antes da retirada da porção para análise, respeitando-se os prazos de validade dos produtos.

Tabela 4 – Identificação das amostras de produtos de tomate adquiridas nas cidades de Campinas-SP e São Paulo-SP, utilizadas para avaliar a incidência de aflatoxinas.

Produto	Marca	Número de Amostras	Ingredientes especificados na embalagem	Localização Da Fábrica
Catchup picante	A	1	Tomate, açúcar, vinagre, glucose, sal, cebola, pimenta vermelha, pimenta do reino, glutamato monossódico e canela	SP
Catchup picante	B	1	Vinagre, polpa de tomate, açúcar, amido de milho, sal, condimentos e benzoato de sódio	SC
Catchup picante	C	1	Tomate, açúcar, sal pimenta vermelha, condimentos e especiarias	SP
Catchup picante	D	1	Polpa de tomate, açúcar, xarope de glicose, vinagre, sal, pimenta vermelha, glutamato monossódico e aroma natural composto	RS
Catchup picante	E	1	Tomate, açúcar, vinagre, glucose, pimenta vermelha, sal, cebola, alho, conservante sorbato de potássio e condimento	GO
Catchup picante	F	1	Tomate concentrado, vinagre destilado, açúcar, xarope de milho, molho de pimenta tabasco, calda de milho, sal, aroma natural, cebola em pó, especiarias	EUA
Catchup tradicional	B	1	Vinagre, polpa de tomate, açúcar, amido de milho, sal, condimentos e conservador benzoato de sódio	SC
Catchup tradicional	E	1	Tomate concentrado, açúcar, vinagre, sal, condimentos, conservantes sorbato de potássio	GO
Catchup tradicional	G	1	Tomate, açúcar, vinagre, xarope de glucose, sal, pimenta, salsa, cebola, alho e aromatizantes naturais	GO

Tabela 4 – Identificação das amostras de produtos de tomate adquiridas nas cidades de Campinas-SP e São Paulo-SP, utilizadas para avaliar a incidência de aflatoxinas (continuação).

Produto	Marca	Número de Amostras	Ingredientes especificados na embalagem	Localização Da Fábrica
Catchup tradicional	A	1	Tomate, açúcar, vinagre, glucose, sal, cebola, pimenta vermelha, pimenta do reino, glutamato monossódico e canela	SP
Catchup tradicional	C	1	Tomate, açúcar, vinagre, sal, condimentos, especiarias e conservante sorbato de potássio	SP
Catchup tradicional	H	1	Tomate, açúcar, vinagre, glucose, sal pimenta, cebola, alho e aromas naturais de noz moscada e canela	GO
Catchup tradicional	I	1	Tomate, açúcar, vinagre, glucose, sal e condimentos	GO
Catchup tradicional	J	1	Polpa de tomate, açúcar, vinagre, sal, condimentos e especiarias	GO
Catchup tradicional	K	1	Tomate, vinagre, sal, açúcar, pimenta do reino, cravo e canela. Conservante Cl e amido	SP
Extrato	L	2	Tomate, açúcar e sal	MG
Extrato	J	2	Tomate, sal açúcar e água	GO
Extrato	M	1	Polpa de tomate, água, sal e açúcar	GO
Extrato	N	2	Não consta	Não consta
Extrato	C	1	Tomate, sal e açúcar	SP
Extrato	H	1	Tomate e sal	GO
Extrato	D	1	Polpa de tomate, sal e açúcar	RS
Extrato	O	1	Tomate, açúcar e sal	GO
Extrato	I	1	Tomate e sal	GO
Extrato	A	1	Tomate, sal e açúcar	GO
Extrato	P	1	Tomate, açúcar e sal	GO
Extrato	Q	1	Tomate, sal e açúcar	SP
Polpa	Q	1	Tomate, sal e açúcar	SP
Polpa	I	1	Tomate e sal	GO

Tabela 4 – Identificação das amostras de produtos de tomate adquiridas nas cidades de Campinas-SP e São Paulo-SP, utilizadas para avaliar a incidência de aflatoxinas (continuação).

Produto	Marca	Número de Amostras	Ingredientes especificados na embalagem	Localização Da Fábrica
Polpa	D	1	Polpa de tomate e sal refinado	RS
Polpa	A	1	Tomate, sal e açúcar	GO
Polpa	O	1	Tomate, sal e açúcar	GO
Polpa	J	2	Tomate e sal	SP
Polpa	R	2	Tomate, açúcar e sal	GO
Polpa	C	2	Tomate, sal, açúcar	SP
Polpa	S	1	Tomate e sal	GO
Polpa	T	2	tomate	GO
Purê	N	1	Tomate e açúcar	GO
Purê	I	1	Tomate e sal	GO
Purê	H	2	tomate	GO
Purê	C	3	Tomate, sal e água	SP
Tomate desidratado	U	1	Tomate maduro desidratado	SP
Tomate desidratado	V	1	tomate	SP
Tomate desidratado	X	2	Tomate	SP
Tomate seco em conserva	Y	1	A granel	SP
Tomate seco em conserva	W	1	A granel	SP
Tomate seco em conserva	Z	1	A granel	SP
Tomate seco em conserva	AA	1	Tomate, óleo de milho, sal, orégano, pimenta do reino	SP
Tomate seco em conserva	AB	1	Tomate, sal, açúcar, óleo de girassol, azeite e especiarias	SP
Tomate seco em conserva	AC	1	Tomate, açúcar, sal, orégano, alho, óleo de girassol	SP
Tomate seco em conserva	AD	1	Tomate, óleo de girassol, sal e especiarias	SP
Tomate seco em conserva	AE	1	Tomate, óleo de milho, sal, orégano e pimenta do reino	SP
Tomate seco em conserva	AF	1	Tomate, óleo, açúcar, sal, pimenta do reino e especiarias	SP

4.2.2. MÉTODO ANALÍTICO

Foi empregado o método adaptado e avaliado no item 3 (Procedimento 4).

4.2.3. CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICO

Um teste de recuperação foi incluído em cada série de produtos analisada sempre utilizando a mesma matriz. Cada série de análises continha de 1 a 4 amostras, todas do mesmo tipo de produto.

Os níveis de adição utilizados foram:

- Nível de adição I - Aflatoxina B₁ – 6,76 µg/Kg; Aflatoxina B₂ – 5,73 µg/Kg; Aflatoxina G₁ – 8,10 µg/Kg e Aflatoxina G₂ – 5,91 µg/Kg.

- Nível de adição II - Aflatoxina B₁ – 16,91 µg/Kg; Aflatoxina B₂ – 14,33 µg/Kg; Aflatoxina G₁ – 20,27 µg/Kg e Aflatoxina G₂ – 14,78 µg/Kg.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Além da presença de fungo potencialmente toxigênico em um alimento, o volume de infecção pelo fungo (número de unidades formadoras de colônias) é outro aspecto determinante para o aparecimento de quantidades detectáveis da toxina. Portanto, a seleção dos frutos e seu armazenamento adequado na etapa pré-processamento são cruciais para garantir um produto livre de toxinas.

Outro aspecto importante na produção de micotoxinas em um alimento é a presença ou não de compostos capazes de inibir a síntese da toxina. Os inibidores por sua vez, devem estar presentes em concentração suficiente para serem parcial ou totalmente eficientes. Os tomates apresentam em sua composição uma gama de fenóis, flavonóides ou não, que são potencialmente capazes de inibir a

síntese destas toxinas. Não se sabe, porém, se estão em concentração suficiente para esta tarefa.

Foi demonstrado que aflatoxinas são produzidas em tomates quando estes são inoculados com linhagem toxigênica. Não foram encontradas, no entanto, até o presente aflatoxinas em produtos de tomate naturalmente contaminado com os fungos produtores.

No presente trabalho foi realizado um levantamento de incidência de aflatoxinas em produtos de tomate onde foram analisadas 6 amostras de catchup picante, correspondendo a 6 marcas, provenientes dos Estados de SC, SP, RS, GO e uma amostra de marca importada dos EUA. Do catchup tradicional foram analisadas 9 amostras (9 marcas, proveniência: SC, SP, GO). Foram ainda analisadas 15 amostras de extrato de tomate (12 marcas, proveniência: MG, SP, GO), 14 amostras de polpa de tomate (10 marcas, proveniência: SP, RS, GO), 7 amostras de purê de tomate (4 marcas, proveniência: SP, GO), 4 amostras de tomate desidratado (3 marcas) e 8 amostras de tomate seco em óleo (8 marcas, 3 comercializadas a granel). Em todas as amostras de produtos de tomate analisadas não foram detectadas aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ considerando-se os limites de detecção do método avaliado para cada tipo de produto. Ao todo foram examinadas amostras de 29 marcas provenientes de 5 Estados e uma do exterior. Os resultados indicam não haver perigo para a saúde do consumidor com relação à possível presença de aflatoxinas nos produtos de tomate analisados.

5. CONCLUSÕES

Foi adaptado e avaliado um método para determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em produtos de tomate por cromatografia em camada delgada. O método apresentou uma recuperação média de 86% e limites de detecção entre 2 e 7 ng/g, dependendo do tipo de produto.

Foi realizado um levantamento da contaminação por aflatoxinas em produtos de tomate comercializados nas cidades de Campinas –SP e São Paulo – SP. Foram analisadas ao todo 63 amostras e as aflatoxinas não foram detectadas em nenhuma amostra dos produtos analisados no estudo realizado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acar, J. and Klaushofer, H. Vorkommen und Nachweis von Patulin in handelsüblichen Tomatenpasten. *Ernährung / Nutrition*, 8 (6), 323-326, 1984.

AOAC International. Official Methods of Analysis, 16^a Edição, Gaithersburg, EUA, 1998.

Ayres, J.C.; Kraft, A.A.; Peirce, L.C. Delaying Spoilage of Tomatoes. *Food Technology*, 18,100-103, 1964.

Baglioni, F.; Gumerato, H.F.; Massaguer, P.R. Ocorrência de fungos filamentosos termo-resistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19 (2), 258- 263, 1999.

Basker, D., Dolev, D. and Gillis, J. A sequential analytical method for the Howard Mould Count Test of Tomato Products. *J. Sci. Fd Agric.*, 28:766-774, 1977.

Betina, V. Thin Layer Chromatography of Mycotoxins. *Journal of Chromatography*, 334 (3), 211-276, 1985.

Betina, V. Chromatographic Methods as Tools in the Field of Mycotoxins. *Journal of Chromatography*, 477 (2), 187-233, 1989.

Bobbio, F. O. e Bobbio, P.A. Introdução à química de alimentos. Livraria Varela, São Paulo, 2^a. Edição, 223p., 1992.

Council for Agricultural Science and Technology. *Mycotoxins – Economic And Health Risks*. Iowa, EUA, Library of Congress, No.116, 92p, 1989.

Fleuriet, A. Évolution des composés phénoliques au cours de la croissance et de la maturation des fruits de tomates "cerise" (*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*). *Fruits*, 31(2):117-126, 1976.

Gelosa, L. La ricerca delle Micotossine in un laboratorio di Sanità pubblica. *Industrie Alimentari*, marzo, 175-178, 1983.

Gilbert, J. Recent advances in analytical methods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 10(1):37-48, 1993.

Goulart, R. e Carvalho, J.P.P. Presença de filamentos micelianos em produtos derivados do tomate, vendidos nos supermercados de Florianópolis-SC. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 3(2):169-180, 1983.

Harwig, J.; Scott, P.M.; Stoltz, D.R.; Blanchfield, B.J. Toxins of Molds from Decaying Tomato Fruit. *Applied and Environmental Microbiology*, 38 (2), 267-274, 1979.

Hua, S-ST.; Grosjean, O.-K; Baker, J.L. Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Letters in Applied Microbiology*, 29:289-291, 1999.

International Agency for Research on Cancer. *Aflatoxins*. In: IARC Monograph On The Evaluation Of Carcinogenic Risk To Humans, no. 56, 245-391. World Health Organization, Lyon, France, 1993.

Kawashima, L.M.; Soares, L.M.V.; Massaguer, P.R. The Development of an Analytical Method for Two Mycotoxins, Patulin And Verruculogen, and Survey of Their Presence in Commercial Tomato Pulp, *Brazilian Journal of Microbiology*, No Prelo, 2002.

Lendvai, I., Boldog-Gyori, Á., Fábri, I. and Kardos-Huszár, I. A study of the Howard Count of Tomato Pulp with a view to its use in the control of plant hygiene. *Acta Alimentaria*, 5(1):41-48, 1976.

Lucisano, A.; Campanini, M.; Casolari, A. Contributo allo studio ambientali che condizionano la produzione di aflatossine negli alimenti. *Industria conserve*, 47(1):27-31, 1972.

Mallozzi, M.A.B.; Corrêa, B.; Haraguchi, M.; Neto, F.B. Effect of flavonoids on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Revista de Microbiologia*, 27:161-165, 1996.

Marasas, W.F.O.; Nelson, P.E. *Mycotoxicology*. The Pennsylvania State University Press, State College, EUA, 102p, 1987.

Martínez-Valverde, I.; Periago, M.J.; Provan, G.; Chesson, A. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of the Science and Food Agriculture*, 82:323-330, 2002.

Minami, K. e Fonseca, H. *Tomate – Produção, Pré-processamento e transformação agroindustrial*. Série Extensão Agroindustrial nº 8, 92p., 1982.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Agricultura Brasileira em Números*. Secretaria de Política Agrícola, Departamento de Planejamento Agrícola, www.agricultura.gov.br/spa/indice03.htm

Mislivec, P.B.; Bruce, V.R.; Stack, M.E.; Bandler, R. Molds And Tenuazonic Acid In Fresh Tomatoes Used For Catsup Production. *Journal of Food Protection*, 50(1):38-41, 1987.

Motta, S.; Soares, L.M.V. Survey Of Brazilian Tomato Products For Alternariol, Alternariol Monomethyl Ether, Tenuazonic Acid, And Cyclopiazonic Acid. *Food Additives and Contaminants*, 18 (7), 630-634, 2001.

Mundt, J.O.; Norman, J.M. Metabiosis And pH Of Moldy Fresh Tomatoes. *Journal of Food Protection*, 45(9): 829-832, 1982.

Mutti, P.; Dellapina, G. and Spotti, E. Produzione, Stabilità, Diffusione, Screening di Aflatossine in Derivati del Pomodoro. *Industria Conserve*, 67:39-41, 1992 a.

Mutti, P.; Dellapina, G. and Spotti, E. Valutazione di Kit Immunologici Disponibili in Commercio per la Determinazione di Aflatossine in Derivati del Pomodoro. *Industria Conserve*, 67:42-44, 1992 b.

Oladiran, A.O.; Iwu, L.N. Studies On The Fungi Associated With Tomato Fruit Rots And Effects Of Environment On Storage. *Mycopathologia*, 121:157-161, 1993.

Pitt, J.I. ; Tomaska, L. Are mycotoxins a health hazard in Australia? I. Aflatoxins and Fusarium toxins. *Food Australia*, 53: 535539, 2001.

Ozcelik, S.; Ozcelik, N.; Beuchat, L.R. Toxin Production By *Alternaria Alternata* In Tomatoes And Apples Stored Under Various Conditions By High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal Of Food Microbiology*, 11:187-194, 1990.

Resolução nº12/78 do CNNPA – aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. *Diário Oficial da União*, 24 de julho de 1978.

Scott, P.M. Methods Of Analysis For Mycotoxins – An Overview. In: *Analysis Of Oilseeds, Fats And Fatty Foods*. Elsevier, London, 141-183, 1991.

Scott, P.M. Mycotoxin Methodology. *Food Additives and Contaminants*, 12(3):395-403, 1995.

Scott, P.M. and Kanhere, S.R. Liquid Chromatographic Determination of Tenuazonic Acids in Tomato Paste. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 63(3):612-621, 1980.

Senter, S.D.; Cox, N.A.; Bailey, J.S. and Forbus, W.R. Microbiological Changes in Fresh Market Tomatoes During Packing Operations. *Journal of Food Science*, 50:254-255, 1985.

Soares, L.M.V.; Rodriguez-Amaya, D.B. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in Some Brazilian Foods by Using Multi-toxin Thin- Layer Chromatographic Method. *Journal of the Association of Analytical Chemists*, 72(1):22-26, 1989.

Stack, M.E.; Mislivec, P.B.; Roach, J.A.G.; Pohland, A. E. Liquid Chromatographic Determination of Tenuazonic Acid And Alternariol Methyl Ether In Tomatoes And Tomato Products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 68(4):640-642, 1985.

Stinson, P.S.; Bills, D.D.; Osman, S.F.; Siciliano, J.; Ceponis, M.J.; And Heisler, E.G. Mycotoxin Production by *Alternaria* Species Grown on Apples, Tomatoes, and Blueberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 28:960-963, 1980.

Stinson, E.E.; Osman, S.F.; Heisler, E.G.; Siciliano, J.; And Bills, D.D. Mycotoxin Production in Whole Tomatoes, Apples, Oranges and Lemons. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 29: 790-792, 1981.