



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**ANDREA REBOUÇAS ROCHA**

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> E G<sub>2</sub> EM  
CERVEJAS PRODUZIDAS NO BRASIL E SUA AVALIAÇÃO  
DE RISCO CARCINOGENÉTICO**

**UFBA**

SALVADOR

2021



**ANDREA REBOUÇAS ROCHA**

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> E G<sub>2</sub> EM  
CERVEJAS PRODUZIDAS NO BRASIL E SUA AVALIAÇÃO  
DE RISCO CARCINOGENÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PGAl) da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. José Antônio Menezes Filho

*Orientador*

Prof. Dr. Leonardo Fonseca Maciel

*Coorientador*

SALVADOR

2021

Rocha, Andrea Rebouças.

Ocorrência de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em cervejas produzidas no Brasil e sua avaliação de risco carcinogênico / Andrea Rebouças Rocha. - 2021.

74 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Menezes Filho.

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Fonseca Maciel.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2021.

1. Alimentos - Contaminação. 2. Bebidas alcoólicas. 3. Cerveja. 4. Aflatoxina. 5. Avaliação de riscos de saúde. I. Menezes Filho, José Antônio. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 641.23

CDU - 641.87



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

## TERMO DE APROVAÇÃO

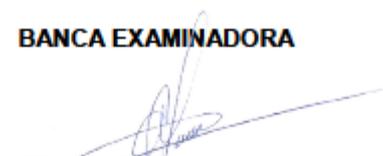
**ANDREA REBOUÇAS ROCHA**

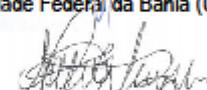
***OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 E G2 EM CERVEJAS PRODUZIDAS NO BRASIL E SUA AVALIAÇÃO DE RISCO CARCINOGÊNICO***

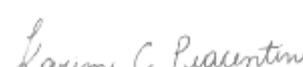
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 10 de dezembro de 2021.

### BANCA EXAMINADORA

  
**Dr. JOSÉ ANTÔNIO MENEZES FILHO (ORIENTADOR)**  
Universidade Federal da Bahia (UFBA, BA)

  
**Dr. ALINE CAMARÃO TELLES BIASOTO (EXAMINADORA)**  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, PE)

  
**Dr. KARIM CRISTINA PIACENTINI (EXAMINADORA)**  
SYNGENTA Proteção de Cultivos (SYNGENTA, SP)

**Dedico este trabalho,**

*À minha mãe, ao meu pai, a toda minha família, amigos e  
as pessoas que fizeram parte dessa caminhada*

## **Meus agradecimentos,**

*Agradeço a Deus e ao axé.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa de estudos concedida (nº do processo: BOL0903/2019).*

*Ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PGAli) da UFBA.*

*Ao prof. Dr. José Antônio Menezes Filho pelos ensinamentos e orientação. Agradeço pela oportunidade de realizar um projeto de pesquisa tão relevante que me proporcionou imenso aprendizado.*

*Ao meu coorientador Dr. Leonardo Maciel por todo apoio e ensinamentos. Agradeço por ter compartilhado materiais e reagentes que foram necessários para as análises.*

*À Dr<sup>a</sup> Karim Cristina Piacentini e à Dr<sup>a</sup>. Aline Camarão Telles Biasoto por participarem da banca avaliadora desta dissertação de mestrado e pelas contribuições dadas ao trabalho.*

*Aos meus queridos amigos Mariana Cardosos e José Antônio (Comando) pelo companheirismo, amizade e por terem me ajudado bastante nas análises. Agradeço por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis do mestrado.*

*À toda a equipe do Laboratório de Toxicologia da UFBA (LabTox) pelo incentivo e sinergia.*

*À professora Dr<sup>a</sup> Janice Druzian, a sua trajetória admirável é uma grande inspiração para todos nós.*

*À Priscila Oliveira, assistente de administração do P GALi, pela gentileza e atenção.*

*Agradeço à minha família e aos meus amigos por sempre me apoiarem nos momentos mais difíceis. O incentivo de vocês foi muito importante para a realização dessa conquista.*

*Ao meu pai André Damião Rocha e à minha mãe Nelma Almeida Rebouças pelo amor incondicional, incentivo e apoio. Os meus pais sempre priorizaram a minha educação e me proporcionaram as condições necessárias para que eu pudesse ir em busca dos meus objetivos.*

*Ao meu irmão Maurício pelos ensinamentos e por sempre torcer pelo meu sucesso. Meu irmão, você é uma grande inspiração para mim. Obrigada por tudo!*

*Ao meu tio Dodó, à minha tia Ana e aos meus primos Tereza, Susana e Raí pelo acolhimento e amor. Vocês são muito importantes para a minha vida. Obrigada por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis, o apoio de vocês me ajudou bastante a conseguir essa conquista.*

*À minha tia Antônia Albertina por sempre ter me incentivado a estudar e por todo apoio e carinho.*

*À minha avó Cecé e a minha avó Maria pelos ensinamentos valiosíssimos. As minhas avós sempre têm palavras doces que me trazem serenidade e perseverança.*

*Aos meus amigos e colegas de trabalho do Senai ITED pelo apoio e pelas discussões riquíssimas que me proporcionam muito aprendizado.*

*Ao meu namorado Nuno Teles pelo amor, cumplicidade e incentivo.*

## RESUMO

Aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que contaminam uma grande variedade de cereais, incluindo ingredientes e adjuntos utilizados no processamento da cerveja. Devido à sua elevada termoestabilidade, as aflatoxinas podem ser transferidas da matéria-prima para a cerveja. A exposição às aflatoxinas é bastante preocupante, pois esses contaminantes apresentam elevado potencial tóxico com efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos. A cerveja é a bebida alcóolica mais consumida no Brasil, e assim, faz-se necessário avaliar a ocorrência das aflatoxinas e avaliar o risco carcinogênico decorrente da exposição a esses contaminantes. Os objetivos deste estudo foram (i) avaliar a ocorrência das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em cervejas, com e sem adjuntos, comercializadas no Brasil e (ii) realizar avaliação de risco carcinogênico decorrente da exposição às aflatoxinas pelo consumo dessas cervejas. Foram analisadas 60 amostras de cerveja (30 com adjunto e 30 sem adjunto) das principais marcas industriais comercializadas no Brasil. Um método analítico por CLAE com detecção por fluorescência foi validado. A extração e purificação das aflatoxinas foram realizadas em colunas de imunoafinidade. O limite de quantificação (LQ) variou de 10 a 30 ng.L<sup>-1</sup> e as recuperações médias foram 88,5%, 98,0%, 98,3%, 110,1%, para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, respectivamente. A avaliação de risco foi realizada através da determinação da margem de exposição (MOE) em dois cenários: consumo médio e alto consumo para homens e mulheres separadamente. Do total das amostras de cerveja (n=60), 88,3% apresentaram a ocorrência de, no mínimo, uma das aflatoxinas. Os níveis medianos das AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> foram inferiores ao LD/LQ. A AFB<sub>2</sub> apresentou os níveis mais elevados de contaminação nas amostras analisadas. Houve diferença significativa entre os níveis de AFB<sub>2</sub> nas amostras de cerveja com e sem adjunto (p=0,003), os teores medianos de AFB<sub>2</sub> foram de 27,0 e 40,4 ng.L<sup>-1</sup> para o grupo de cerveja com e sem adjunto, respectivamente. Em oposição aos nossos resultados, estudos que realizaram investigação similar em outros países sugerem que o uso de adjuntos pode contribuir para a ocorrência de aflatoxinas nessa bebida. Neste estudo, identificamos que além da necessidade de avaliar a ocorrência das aflatoxinas nos adjuntos cervejeiros, também é preciso realizar essa investigação no malte de cevada utilizado para a produção de cerveja no Brasil. No que concerne a avaliação de risco, os valores da MOE correspondente ao consumo elevado de cerveja (> 160 mL/dia) foi de 5303 para a cerveja com adjunto e de 3643 para cerveja sem adjunto. O valor da MOE é inversamente proporcional ao risco, sendo assim o risco de exposição aos efeitos carcinogênicos das aflatoxinas é superior quando há o consumo de cerveja sem adjunto. A caracterização do risco mostrou que pessoas que bebem mais de 1,1 L de cerveja por semana podem estar expostas aos efeitos carcinogênicos da AFB<sub>2</sub>, esse risco é mais elevado para o consumo de cerveja sem adjunto. Esses dados podem contribuir para que as autoridades competentes possam estabelecer limites máximos tolerados de aflatoxinas em cerveja.

**Palavras-chave:** Aflatoxina. Cerveja. Imunoafinidade. CLAE. Avaliação de risco.

## ABSTRACT

Aflatoxins (AFs) are secondary metabolites produced by filamentous fungi that contaminate various cereals. Such contamination affects beer ingredients and adjuncts used in its processing. Due to AFs high thermostability, they can be transferred from raw material to beer. Exposure to aflatoxins is thus of great concern, as these contaminants have high toxic potential and carcinogenic, teratogenic, and mutagenic effects. Since beer is the most consumed alcoholic beverage in Brazil, the assessment of aflatoxins occurrence and carcinogenic risk arising from such exposure are of paramount importance. The objectives of this study were: (i) to evaluate the occurrence of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> in beers, with and without adjuncts, commercialized in Brazil, and (ii) to carry out the carcinogenic risk assessment arising from the exposure to aflatoxins through consumption of those beers. Sixty beer samples (30 with adjunct and 30 without adjunct) of the leading industrial brands produced and commercialized in Brazil were analyzed. An analytical method by HPLC with fluorescence detection was standardized. Aflatoxin extraction and purification were performed on immunoaffinity columns. The limit of quantification (LQ) ranged from 10 ng.L<sup>-1</sup> to 30 ng.L<sup>-1</sup>, and the mean recoveries were 88.5%, 98.0%, 98.3%, and 110.1% for AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, and AFG<sub>2</sub>, respectively. The standardized method showed selectivity, specificity, precision, and accuracy, meeting the requirements established by INMETRO guidelines. The risk assessment was performed by determining the margin of exposure (MOE) in two scenarios: medium consumption and high consumption, for men and women. Of the total beer samples (n=60), 88.3% showed the occurrence of at least one of the AFs. The median levels of AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, and AFG<sub>2</sub> were lower than the LD/LQ. AFB<sub>2</sub> had a higher incidence in the analyzed samples than other aflatoxins. There was a significant difference between the content of AFB<sub>2</sub> in the beer groups with and without adjuncts (p=0.003). The median levels of AFB<sub>2</sub> contents were 27.0 and 40.4 ng.L<sup>-1</sup> for the beer group with and without adjunct, respectively. Contrary to our results, previous studies carried out in other countries suggested that the use of adjuncts may contribute to the occurrence of aflatoxins in beer. Furthermore, we identified that, in addition to the need of assessment of the occurrence of aflatoxins in brewing adjuncts, this test should be carried out on barley malt used for beer production in Brazil. Regarding the risk assessment, MOE values corresponding to high beer consumption (> 160 mL/day) were 5,303 for beer with adjunct and 3,643 for beer without adjunct. The risk characterization showed that people who drink more than 1.1 L per week might be exposed to carcinogenic effects from AFB<sub>2</sub>. The risk is higher for the consumption of beer without an adjunct. These data can thus help the authorities to establish maximum tolerated limits for aflatoxins in beer.

**Keywords:** Aflatoxin. Beer. Immunoaffinity, HPLC. Risk assessment.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AFB<sub>1</sub></b>	Aflatoxina B1
<b>AFB<sub>2</sub></b>	Aflatoxina B2
<b>AFG<sub>1</sub></b>	Aflatoxina G1
<b>AFG<sub>2</sub></b>	Aflatoxina G2
<b>AFT</b>	Aflatoxinas Totais
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>IARC</b>	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO I – Ocorrência de Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em Cervejas Produzidas no Brasil e sua Avaliação de Risco Carcinogênico</i> .....	11
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 Objetivo Geral .....	14
2.1 Objetivos Específicos .....	14
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
3.1 Aflatoxinas .....	15
3.1.1. Aspectos toxicológicos .....	17
3.1.2 Ocorrência de aflatoxinas em alimentos .....	18
3.2 Aflatoxinas em cerveja .....	19
3.2.1 Cerveja .....	19
3.2.2 Ocorrência de aflatoxinas na matéria-prima da cerveja .....	24
3.3.2 Ocorrência de aflatoxinas na cerveja .....	25
3.2.4 Transferência de aflatoxina da matéria-prima para a cerveja .....	27
3.3 Métodos analíticos para determinação de aflatoxinas .....	29
3.4.1 Extração e limpeza/purificação .....	29
3.4.2 Métodos de detecção e quantificação .....	32
3.5 Avaliação de risco .....	37
<b>3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>40</b>
<i>CAPÍTULO II – Manuscrito: Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in beers produced in Brazil and their carcinogenic risk evaluation</i> .....	51

## *Capítulo I*

---

*Ocorrência de Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em Cervejas Produzidas no Brasil e sua  
Avaliação de Risco Carcinogênico*

## 1 INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos das espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (COBOS *et al.*, 2018). Essas toxinas representam uma significativa ameaça à saúde humana e animal devido ao seu potencial toxicogênico, carcinogênico, teratogênico e mutagênico (PLEADIN *et al.*, 2019). São classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC da sua sigla na língua inglesa) como pertencentes ao grupo I, compostos que são carcinogênicos para humanos (IARC, 2012).

Uma grande variedade de importantes produtos agrícolas, incluindo milho, trigo, amendoim, arroz, especiarias, cevada, frutas e nozes são contaminados por aflatoxinas (PATRIARCA *et al.*, 2017; SARMA *et al.*, 2017). Dentre esses, estão os cereais que são matéria-prima da cerveja, tais como a cevada que é o principal ingrediente e o milho e o arroz que são utilizados como adjunto (BENEZOVÁ *et al.*, 2012). As aflatoxinas apresentam elevada estabilidade térmica e assim podem ser transferidas da matéria-prima para a cerveja durante o processo de produção (PERNICA *et al.*, 2019). As etapas críticas do processo cervejeiro que têm influência sobre a taxa de transferência das aflatoxinas da matéria-prima para a cerveja são a malteação, a filtração e a fermentação.

A ocorrência de aflatoxina em cerveja foi relatada em estudos em diferentes países (TRINDER, 1988; NAKAJIMA *et al.*, 1999; MABLY *et al.*, 2005; MATUMBA *et al.*, 2011; BENEZOVÁ *et al.*, 2012; BERTUZZI *et al.*, 2011; BURDASPAL; LEGARDA 2013; KHAN *et al.*, 2013; OKARU *et al.*, 2017). Até o momento, dados sobre a ocorrência de aflatoxinas em cervejas produzidas no Brasil são escassos, sendo que o país é o terceiro maior produtor mundial de cerveja (SINDICERV, 2016). Por possuir um baixo teor alcoólico, a cerveja é consumida em grandes quantidades e regularmente (OKARU *et al.*, 2017). Sendo assim, faz-se necessário investigar a ocorrência de aflatoxina nas cervejas comercializadas no Brasil e estimar o risco de exposição às aflatoxinas devido ao consumo de cerveja.

A determinação de aflatoxinas em alimentos e bebidas requer a utilização de método analítico com elevada sensibilidade, pois esses contaminantes estão presentes na matriz em concentrações residuais (partes por bilhão). Nos últimos anos, houve grande investimento no desenvolvimento de novos métodos analíticos para análise de aflatoxinas em diferentes matrizes (PERNICA, 2019). O procedimento analítico é constituído basicamente de duas etapas: o preparo da amostra (extração e purificação) e a detecção/quantificação. As opções para o preparo da amostra vão desde os métodos tradicionais, como a extração líquido-líquido, até os mais modernos que oferecem maior eficiência, como as colunas de imunoafinidade e o

QuEChRES. A escolha do método para o preparo da amostra é muito importante, pois irá influenciar no tempo de análise, custo e na qualidade dos resultados. É bastante comum o uso de métodos de triagem para a detecção rápidas das aflatoxinas, como o ELISA, principalmente em regiões onde não há disponibilidade de muitos recursos, mas é indicado uma segunda técnica de detecção para confirmação do resultado. A técnica mais utilizada para a detecção/quantificação é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência e/ou espectrometria de massas. Cada método apresenta vantagens e desvantagens, sendo a complexidade da matriz e o custo do método fatores determinantes para a escolha. Em suma, faz-se necessário investigar o estado da arte acerca dos métodos analíticos para determinação de teores de aflatoxinas em cerveja.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- ✓ Determinar os teores de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> em cervejas produzidas industrialmente e comercializadas no Brasil e realizar a avaliação de risco carcinogênico referente ao consumo dessas cervejas.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- ✓ Desenvolver metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência para detecção e quantificação de aflatoxina em cerveja.
- ✓ Diferenciar os teores de aflatoxinas em amostras de cerveja com e sem adjunto produzidas industrialmente e comercializadas no Brasil.
- ✓ Avaliar se há diferença entre os teores de aflatoxinas em cervejas sem e com adjunto.
- ✓ Estimar o risco para o consumo humano da ingestão de aflatoxinas em cervejas com sem adjunto.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

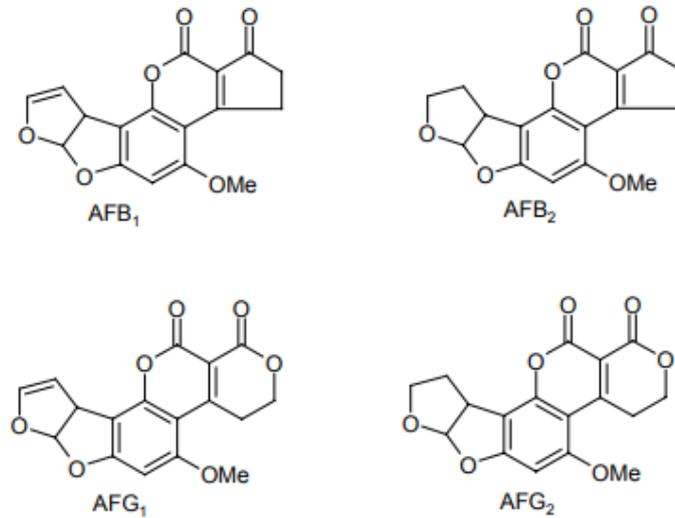
#### 3.1 Aflatoxinas

A palavra micotoxina é originada dos termos “*mykes*”, do grego, que significa fungos e “*toxicum*”, do latim, que quer dizer veneno (TURNER *et al.*, 2009), sendo assim, significa literalmente substância venenosa produzida por fungos. Bennet (1987) define as micotoxinas como sendo metabólitos de fungos que têm uma resposta tóxica em humanos e animais mesmo em pequenas doses. As síndromes de toxicidade resultantes da ingestão dessas substâncias são denominadas micotoxicoses (GOLDBLATT, 1973). Provavelmente, a primeira micotoxicose conhecida foi o ergotismo, causada pelo fungo da espécie *Claviceps purpúrea*, sendo que o surto dessa doença causou milhares de mortes na Rússia, Inglaterra e França em meados de 1920 (WHO, 1990).

Na década de 1960, na Inglaterra, ocorreu um surto que matou mais de 100.000 perus, uma vez que não se tinha conhecimento acerca da enfermidade responsável, denominou-se de “doença X dos perus” (BLOUNT, 1961). Os estudos realizados na época demonstraram que a causa desse surto foi a contaminação por toxinas na pasta de amendoim importada do Brasil utilizada para a alimentação das aves (FONSECA, 1975; SACRAMENTO *et al.*, 2016). Foi identificado que essas toxinas eram produzidas pela espécie de fungos *Aspergillus flavus*, por isso, foram denominadas de aflatoxinas (NEWBERNE; BUTLER, 1969). A palavra aflatoxina é formada pelo prefixo “a” que representa o gênero *Aspergillus*, o termo “fla” é devido a espécie *Flavus*, e “toxina” que significa veneno (ELLIS *et al.*, 1991). Os surtos ocasionados pelas aflatoxinas impulsionaram as pesquisas sobre as micotoxinas devido ao seu elevado potencial tóxico (PERAICA *et al.*, 1999).

As aflatoxinas são metabólitos secundários de fungos filamentosos, isso significa que não são utilizadas pelos fungos para o seu crescimento e sim para a competição com outras espécies (KAWASHIMA, 2004). São produzidas pelas espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus* (ABARCA *et al.*, 2000) e atualmente existem cerca de 17 compostos designados por aflatoxinas, porém os que apresentam maior relevância são as aflatoxinas B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) devido à sua maior incidência em alimentos (OLIVEIRA e GERMANO, 1997). De acordo com a sua estrutura química (figura 1), são classificadas como derivados de difuranocumarina, que são bezeno-derivados da pirona (MIRANDA, 2011), e apresentam uma estrutura heterocíclica com cinco anéis (APPLEBRAUM *et al.*, 1982, VENTURA, 2006).

**Figura 1** - Estrutura química das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.



**Fonte:** Ammida et al. (2014).

Pode-se classificar as aflatoxinas em dois grupos, a série B de “blue” devido a emissão da luz azul na fluorescência, são as difuro-cumaro-ciclo-pentanonas e a série G, de “green” pois emitem fluorescência na cor verde e são as difuro-cumaro-lactonas (URREGO NOVOA *et al.*, 2006). A fluorescência intrínseca das aflatoxinas é decorrente da presença de uma cadeia de ligações conjugadas e de heteroátomos na estrutura molecular (MOLINA-GARCIA *et al.*, 2012). A ligação dupla do éter de vinil C8=C9 no anel furano terminal das AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, as torna com maior potencial carcinogênico, genotóxico e imunossupressor quando comparadas com as AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (JAIMEZ *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 2018).

As aflatoxinas são incolores, insípidas e inodoras e apresentam estabilidade térmica quando estão na matriz alimentar, não sendo degradadas durante o processo de cozimento dos alimentos (TABATA *et al.*, 1992; URREGO NOVOA, 2006). De acordo com experimento realizado por Tabata *et al.* (1992), quando estão dissolvidas apenas em água apresentam uma taxa de degradação de cerca de 80% após o cozimento, enquanto que quando estão na matriz alimentar a taxa de degradação diminui para 10% a 30%, isso sugere que a interação com os componentes da matriz dificulta a degradação térmica das aflatoxinas. As AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> são mais estáveis a degradação térmica do que as AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (TABATA *et al.*, 1992). Algumas das propriedades físico-químicas das aflatoxinas estão descritas no quadro 1.

**Quadro 1-** Características físico-químicas das aflatoxinas

Tipo de Aflatoxina	Fórmula Estrutural	Peso Molecular	Ponto de Fusão (°C)
Série 1: difuro-cumaro-ciclo-pentanonas			
AFB <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269
AFB <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289
Série 2: difuro-cumaro-lactonas			
AFG <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	328	244-246
AFG <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240

*Fonte: Adaptado de Urrego Nova (2006)*

### 3.1.1 Aspectos toxicológicos

As aflatoxinas estão entre as substâncias mutagênicas e carcinogênicas mais potentes conhecidas pelo homem (WILLIAM *et al.*, 2004). Os efeitos biológicos das AFs podem ser classificados em dois grupos: efeitos agudos, quando há alto nível de exposição em um curto intervalo de tempo, e crônicos, quando ocorre exposição em pequenas doses e durante um longo intervalo de tempo. Os sintomas causados pela aflatoxicose aguda são febre, dor abdominal, vômito, diarreia, mal-estar e enfermidades no fígado (WU, 2015; OKARU *et al.*, 2017). Dentre as enfermidades hepáticas, tem-se destaque a síndrome de Rey que é uma doença hepática com degeneração gordurosa das vísceras e a síndrome de Kwashiorkor que tem como sintomas a hipoalbuminemia, imunossupressão e fígado gorduroso (OLIVEIRA, 1997; PENA, 2007). Os efeitos crônicos são os teratogênicos, carcinogênicos e alterações genéticas (HAYES, 1978).

As aflatoxinas são classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) no grupo I que corresponde aos compostos que são carcinogênicos para humanos (IARC, 2012). Dentre as aflatoxinas, a de maior ocorrência na contaminação de alimentos e rações é a AFB<sub>1</sub>, justamente a que apresenta maior potencial tóxico (BENEZOVA *et al.*, 2012). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a exposição às aflatoxinas em sinergia com a hepatite B potencializa o risco de câncer hepático (HENRY *et al.*, 2002, LIU *et al.* 2012), pois essa doença contribui com a manifestação do fenótipo do tumor que provoca o câncer hepatocelular (HENRY *et al.*, 2002, LIU *et al.*, 2012; SACRAMENTO *et al.*, 2016). Em populações com ambos os fatores de risco, como na China e África do Sul, o risco de ocorrência

do câncer hepático é 60 vezes superior em situação na qual há sinergia de ambos os fatores de risco (SACRAMENTO, 2016).

A AFB<sub>1</sub> é um potente agente hepatocarcinogênico, mas para que manifeste os seus efeitos tóxicos é necessário que sofra uma biotransformação metabólica (SCOTT; LAWRENCE, 1997; PENA *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2006). Quando ocorre a exposição à AFB<sub>1</sub> através da dieta, essas toxinas são absorvidas rapidamente pelo intestino delgado devido ao seu baixo peso molecular e características lipofílicas através da difusão passiva. Posteriormente, são transportadas até o fígado onde ficam concentradas na membrana do hepatócito e sofrem biotransformação pelas enzimas hepáticas (SACRAMENTO, 2016). O produto final do processo de ativação metabólica da AFB<sub>1</sub> é a AFB<sub>1</sub>-8,9 epóxido, composto que apresenta propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (GONG *et al.*, 2016). A AFB<sub>1</sub>-8,9 epóxido é uma molécula bastante eletrofílica e instável que reage rapidamente com outras macromoléculas celulares, como as proteínas, o RNA e o DNA (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). A reação da AFB<sub>1</sub>-8,9 epóxido com DNA é realizada por meio de ligações covalentes com guaninas, formando adutos que podem resultar em erros de transcrição, levando a mutações, e possivelmente câncer (FERREIRA, 2006; PENA *et al.*, 2007, SACRAMENTO, 2016).

**Figura 2** - Conversão da AFB<sub>1</sub> na forma ativa e tóxica.



*Fonte: Pena (2006).*

### 3.1.2 Ocorrência de aflatoxinas em alimentos

Estima-se que aproximadamente 500 milhões de pessoas no mundo estejam expostas às aflatoxinas através da alimentação (SMITH *et al.*, 2017). Esses dados demonstram que a contaminação de alimentos por aflatoxinas é um grave problema de saúde pública.

A contaminação por aflatoxinas ocorre em todos os níveis da cadeia alimentar, podendo ocorrer no campo ou após a colheita (BENEZOVA *et al.*, 2012). Essa contaminação está relacionada a dois principais fatores: a variação climática e aos procedimentos de colheita e estocagem. O clima quente e úmido é favorável ao desenvolvimento de fungos da espécie *Aspergillus* e, conseqüentemente, à produção de aflatoxinas (RODRÍGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002; HAJNAL *et al.*, 2017), sendo que a temperatura ideal é entre 25 e 42 °C (SANTIN, 2005). Os procedimentos de colheita e estocagem devem seguir as boas práticas agrícolas. Existem fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam na formação das micotoxinas em grãos, tais como, a umidade, níveis de oxigênio e dióxido de carbono, temperatura, danos físicos na semente, nível da infecção, prevalência de cepas toxicogênicas e interações microbiológicas (ABRAMSOM *et al.*, 1999). Sendo assim, é importante o desenvolvimento de programas de monitoramento dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas para estabelecer prioridades em ações de controle de qualidade e vigilância sanitária (CALDAS *et al.*, 2002). A melhor maneira de prevenir a contaminação é investindo em boas práticas na produção agrícola, garantindo um rígido controle da temperatura e umidade no armazenamento dos grãos para evitar a proliferação de fungo nos grãos (RUIZ-MEDINA *et al.*, 2015)

As aflatoxinas são um grupo de contaminantes de grande importância no controle de qualidade de alimentos e rações (AMARAL *et al.*, 2006). Podem estar presentes em nozes, cereais, arroz, milho, amendoim, semente de algodão, cevada, figos, frutas e especiarias e outros alimentos (PERAICA, 1999; RASCH *et al.*, 2010). Dentre os grãos que são comumente acometidos pelas aflatoxinas, estão as matérias-primas da cerveja, como cevada e o milho, e assim, essas micotoxinas podem ser transferidas da matéria-prima para a cerveja (TURNER *et al.*, 2009; RASCH *et al.*, 2010, BERTUZZI *et al.*, 2011).

## **3.2 Aflatoxinas em cerveja**

### **3.2.1 Cerveja**

Não existe consenso em relação à exata origem das primeiras cervejas, mas os sumérios são considerados um dos pioneiros na fabricação dessa bebida há cerca de 8.000 anos A.C. na Mesopotâmia, região do Oriente Médio (ROSA; AFONSO, 2014). Na época, era comum realizar a moagem dos grãos de cevada para a fabricação de pão e, eventualmente, a massa

úmida era deixada por um longo período sob a ação do calor, o que favorecia o processo de fermentação pelas leveduras selvagens. Dessa forma, acidentalmente, ocorreu o surgimento do “pão líquido”, bebida alcoólica que deu origem a cerveja (TSCHOPE, 2001). A chegada da cerveja no Brasil ocorreu em 1808 com a mudança da família real portuguesa da corte para a colônia (SIQUEIRA *et al.*, 2008). Porém, a primeira notícia sobre a produção de cerveja no país é de 1836, em um anúncio publicado no Jornal do Comercio no Rio de Janeiro (DE PAULA SANTOS, 2003). No início, a cerveja produzida possuía qualidade inferior à que existe atualmente, pois naquela época existia pouco conhecimento acerca dos processos bioquímicos inerentes a produção dessa bebida (ARAUJO, 2016).

Com o intuito de garantir a qualidade da cerveja, no século XIV, foi promulgada a Lei da Pureza, pelo Duque Guilherme IV da Baviera na Alemanha. Essa lei estabeleceu que a cerveja só poderia ser produzida com três ingredientes: água, malte e lúpulo, no período não se tinha conhecimento sobre a levedura (VENTURINI, 2000). A lei da Pureza influenciou consideravelmente a produção de cerveja, entretanto, alguns países passaram a incluir outros ingredientes na produção dessa bebida. Nos Estados Unidos, em 1870, foi experimentado o uso de adjuntos na produção de cerveja, com o intuito de substituir parcialmente o malte de cevada para obter vantagem econômica (ARAUJO, 2016). Atualmente, é permitida a substituição de parte do malte por adjuntos cervejeiros em diversos países, inclusive no Brasil (VENTURINI, 2000). O decreto nº 6.871 do MAPA (2009) define cerveja como sendo a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo, sendo que parte do malte pode ser substituída por adjuntos cervejeiros desde que não exceda 45% do extrato original.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2009), adjuntos cervejeiros são a cevada e demais cereais aptos para consumo humano, malteados ou não, bem como os amidos e açúcares. A malteação consiste em um processo de germinação artificial sob condições de temperatura e umidade controladas. Os adjuntos são utilizados na produção de cerveja por serem uma alternativa para a redução dos custos com as matérias-primas, principalmente em países que não produzem a cevada em larga escala. No Brasil, a produção de cevada é, majoritariamente, destinada para a produção de cerveja. Apesar disso, a cevada produzida no país não é suficiente para suprir a demanda de produção de cerveja, atende a apenas 43% da necessidade da indústria brasileira (D’AVILA *et al.*, 2012; EMBRAPA, 2016).

As cervejas podem ser classificadas de acordo com a quantidade de malte que possuem em sua composição. As bebidas que possuem como única fonte de açúcar o malte de cevada, são nomeadas de “puro malte”, as que tem malte de cevada em quantidade igual ou superior a 55% em peso sobre extrato primitivo são denominadas de cerveja, e as que apresentam uma proporção de malte de cevada superior a 25% e inferior a 55% devem apresentar no rótulo a expressão “cerveja de” e o nome do vegetal que é predominante (MAPA, 2009). São exemplos de adjuntos usados na fabricação de cerveja: cevada, arroz, trigo, centeio, milho, aveia e sorgo (D’AVILA *et al.*, 2012). Sleiman *et al.* (2010) realizaram uma investigação sobre os principais adjuntos utilizados em 161 amostras de cervejas do tipo Pilsen, as mais populares no Brasil, e dentre as amostras analisadas, 91,3% utilizavam milho ou açúcar de cana, 4,3% usavam arroz e 4,3% não usavam adjuntos (eram puro malte). O uso de adjuntos na produção de cerveja auxilia a reduzir o custo, porém, pode contribuir com o aumento do risco de contaminação por micotoxinas (PIETRI *et al.*, 2010; PIACENTINI *et al.*, 2017). Os cereais usados como adjunto na fabricação de cerveja, como milho, arroz e a cevada, são propensos a contaminação por aflatoxinas (ZAO *et al.*, 2016).

### **3.2.1.1 Matérias-primas**

A água é o constituinte majoritário da cerveja, corresponde a, aproximadamente, 92-95% do peso da bebida e deve ter boa qualidade (D’AVILA, 2012). Alguns parâmetros da água, como: pH, teor de turbidez, concentração de sais minerais, padrões microbiológicos, são utilizados como requisito para obtenção de água cervejeira de qualidade (ROSA; AFONSO, 2014). A principal fonte de carboidratos fermentáveis é o malte de cevada (D’VILA *et al.*, 2012). Esta matéria-prima é produzida através da germinação das sementes de cevada em condições de umidade e temperatura controladas (PEREYRA *et al.*, 2011). Existem algumas características que fazem com a cevada seja um cereal ideal para a fabricação de cerveja, tais como, o alto teor de amido, níveis elevados de aminoácidos que contribuem com o crescimento das leveduras e alta concentração de compostos nitrogenados que são importantes para a formação da espuma (CARVALHO, 2007). O lúpulo é fonte de óleos essenciais, polifenóis e resinas amargas, esses compostos que conferem o sabor característico da cerveja (D’VILA *et al.*, 2012).

O malte é produzido através da germinação da cevada em condições de umidade e temperatura controladas, esse processo é denominado maltagem (PEREYRA *et al.*, 2011). A

maltagem é iniciada com a adição de água ao grão até que seja atingido um teor de umidade de cerca de 42-48%, em seguida, ocorre germinação sob condições de temperatura e umidade controladas para favorecer a produção das enzimas que irão promover a hidrólise dos carboidratos, a germinação é interrompida com etapa de torrefação (PASCARI *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2018). A intensidade da torrefação irá determinar a coloração do malte devido à reação de Maillard e de caramelização que ocorrem durante o aquecimento, sendo assim, as cervejas escuras foram produzidas com malte que passou por um processo de torrefação intenso (BARROS; GHESTI *et al.*, 2016).

### **3.2.1.2 Processo de produção**

A fabricação da cerveja é iniciada com a moagem do malte, etapa que tem a finalidade de expor o conteúdo do grão, aumentando a superfície de contato para facilitar a ação enzimática (CARVALHO, 2017). Normalmente, são utilizados moinhos de rolo ou de martelo, recomendáveis para manter a casca parcialmente intacta, evitando a extração de taninos e outros compostos indesejáveis presentes nestas (PASCARI *et al.*, 2018). Em seguida, é realizada a mosturação que consiste na adição de água ao malte triturado e no aquecimento da mistura promovendo a solubilização dos componentes e ativação enzimática (VENTURINI FILHO, 2016). A mosturação é feita com controle do binômio tempo-temperatura, os parâmetros utilizados nessa etapa irão determinar o tipo de cerveja que será produzida (PASCARI *et al.*, 2018).

Após a etapa da mosturação, é realizada a filtração do mosto. Esse processo consiste na separação dos componentes sólidos em suspensão no líquido que não foram dissolvidos no mosto. A fração sólida é constituída pela casca do malte, proteínas coaguladas, restos de parede celular da levedura, dentre outros (VENTURI FILHO; CEREDA, 2001). Em seguida, a cerveja é submetida ao processo de fervura visando a inativação das enzimas, esterilização e formação dos compostos responsáveis pelas características organolépticas desejadas (CURI, 2006). É durante esse tratamento térmico que ocorre a adição do lúpulo e dos adjuntos (quando utilizados) (ARAÚJO, 2016). A adição do lúpulo faz com que ocorra a liberação dos compostos aromáticos e adstringentes que irão contribuir de maneira significativa para o sabor característico da cerveja (ROSA; AFONSO, 2014). O lúpulo é fonte de polifenóis e resinas que conferem o amargor da bebida, além disso, possui propriedades bacteriostáticas (D'AVILA, 2012). A quantidade de lúpulo adicionada irá influenciar no estilo de cerveja produzido. Ao fim

da etapa de fervura, ocorre a separação do *trub* e o resfriamento do mosto. O *trub* é formado por complexos de proteínas, resinas e taninos, através da aplicação de uma força centrípeta por meio de rotação forçada ocorre a sedimentação desses compostos (BRIGGS *et al.*, 2004). Posteriormente, o mosto é resfriado até a temperatura de fermentação.

A fermentação consiste em reações bioquímicas que convertem os açúcares fermentescíveis em etanol e gás carbônico. De acordo com o tipo de fermentação, a cerveja pode ser classificada em dois grupos: de alta (*Ale*) e de baixa fermentação (*Lager*). A nomenclatura é decorrente do posicionamento da levedura na cuba de fermentação. As do tipo *Ale* são produzidas com leveduras no topo da cuba com temperatura variando entre de 12 e 15 °C, normalmente a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada. As cervejas do tipo Lager são fabricadas com as leveduras que ficam no fundo da cuba, com temperaturas inferiores, entre 5 e 10 °C, sendo que a espécie mais utilizada é a *Saccharomyces uvarum* (MEGA *et al.*, 2011; D'AVILA, 2012).

Em seguida é realizada a maturação que tem como objetivo melhorar e estabilizar o sabor da cerveja, através de reações bioquímicas incluindo fermentação secundária (ARAUJO, 2016; PASCARI *et al.*, 2018). Nessa etapa, ocorre a redução da concentração de acetaldeído, diacetil, dentre outros compostos indesejáveis e é promovida a carbonatação do produto (CURI, 2006). Após essa etapa é feita a carbonatação e o envase da cerveja.

### **3.2.1.2 Mercado e consumo**

As bebidas alcoólicas apresentam relevante papel na vida social das pessoas (BELOGLAZOVA *et al.*, 2015). As bebidas que possuem baixo teor alcoólico, como a cerveja, são consumidas em maior quantidade e frequência mais elevada (OKARU *et al.*, 2017). A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no Brasil (OMS, 2018a). O mercado consumidor de cerveja no país é constituído, principalmente, por jovens com idade entre 25 e 44 anos, esse tipo de consumidor corresponde a 61% do mercado (SINDCERV, 2007). Nas últimas décadas, o consumo de cerveja aumentou consideravelmente em países emergentes, como o Brasil (COLEN; SWINNEN, 2010).

O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, com uma produção de 13,3 bilhões de L/ano, o primeiro lugar é da China, com 46 milhões L/ano e o segundo lugar é dos Estados Unidos com 22,1 milhões L/ano (SINDCERV, 2016). De acordo com o IBGE a produção industrial de bebidas alcoólicas cresceu 4,8 % no país em 2018, e esse crescimento

ocorreu na contramão do que foi registrado pela indústria nacional de outros setores. Segundo Muller, em 2018, existiam 835 cervejarias registradas no Brasil e seus produtos somavam 16.968 tipos de cerveja, conforme levantamento do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA).

### 3.2.2 Ocorrência de aflatoxinas na matéria-prima da cerveja

A ocorrência de aflatoxinas na cerveja é devido à contaminação na matéria-prima (INOUE *et al.*, 2017). Há maior incidência de aflatoxinas em países de clima tropical devido às condições ideais de temperatura e umidade para o desenvolvimento dos fungos produtores (KWIATKOWSK e ALVES, 2007). Em países em desenvolvimento, o risco de contaminação pode ser ainda mais elevado devido à dificuldade de implantação das boas práticas agrícolas e de fabricação (GALVANO *et al.*, 2005). O controle de qualidade da matéria-prima é fundamental para a prevenção desse tipo de contaminação.

Estudos que relatam a ocorrência de aflatoxina nos cereais utilizados para a produção de cerveja, principalmente o milho e o arroz que são adjuntos (SIMIONATO *et al.*, 2003; KAWASHIMA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008; BENTO *et al.*, 2012; KATSURAYAMA; TANIWAKI, 2017). No Brasil, o adjunto mais utilizado é o milho (SLEIMAN *et al.*, 2010), esse cereal é comumente relatado como alvo da contaminação por aflatoxina (tabela 1). É possível observar relevante incidência de aflatoxinas nos produtos feitos com milho e no milho *in natura* produzidos no país. Alguns estudos relatam níveis de contaminação superiores ao limite máximo tolerável estabelecido pela RDC nº 7 (BRASIL, 2011) que é de 20  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  para aflatoxinas totais. O arroz é outro adjunto bastante utilizado no Brasil e que também pode contribuir com a contaminação por aflatoxina na cerveja. Burdaspal e Legarda (2003), em estudo conduzido na Espanha, encontraram os níveis mais elevados aflatoxinas nas amostras de cerveja que continham arroz na composição.

Durante o processamento da cerveja pode ocorrer a transferência de aflatoxinas da matéria-prima para a bebida. Entretanto, níveis de aflatoxinas podem ficar retidos no resíduo sólido oriundo do processo cervejeiro. Estudos realizaram a investigação da ocorrência de aflatoxina em resíduo sólido de cervejarias que, normalmente, é utilizado para alimentação de bovinos e suínos (SIMAS *et al.*, 2007; KELLER *et al.*, 2009; GERBALDO *et al.*, 2011). Simas *et al.*, (2007) encontraram 33,75% das amostras positivas para aflatoxinas, com níveis de contaminação entre 1 e 3  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ , em estudo realizado em cervejaria do Recôncavo Baiano

(Bahia, Brasil). Keller *et al.*, (2009) identificaram uma contaminação ainda mais elevada, 45% das amostras positivas com níveis de contaminação entre 7,1 e 32,7  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ , em cervejaria de Campo Grande (Rio de Janeiro, Brasil). Na Argentina, Gerbaldo *et al.*, (2011) realizaram um estudo similar e encontraram amostras contaminadas com nível acima do limite estabelecido pela legislação do país para alimentação animal, que é 20  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ . Os resultados desses estudos demonstram que há contaminação da matéria-prima da cerveja, detectada no resíduo sólido úmido, o que corrobora com o risco de contaminação do produto final.

**Tabela 1** - Ocorrência de aflatoxina em milho em diferentes regiões do país

Região do Brasil	Tipo de amostra	Número de amostras (Ocorrência %)	Nível de contaminação ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ )	Referencia
São Paulo	Milho	(110) 54,5	6 -1600	Machinski <i>et al.</i> , (2001)
Várias regiões do Brasil	Milho	(214) 38,3	0,2-129	Vargas <i>et al.</i> , (2001)
Distrito Federal	Alimento a base de milho	(366) 19,6	1,7*	Caldas <i>et al.</i> , (2002)
Pernambuco	Alimento a base de milho	6,75%	20 **	Kawashima <i>et al.</i> , (2006)
Paraná	Alimento a base de milho	(123) 13%	0,78 ***	Amaral <i>et al.</i> , (2006)
Goiás	Milho	91,7%	nd-277,8	Ramos <i>et al.</i> , (2008)
Mato Grosso	Milho	84 (23,8%)	1-108,7	Bento <i>et al.</i> , (2012)

\* concentração máxima para AFT

\*\* concentração máxima para AFB1

\*\*\* concentração média

nd não detectado;

### 3.3.2 Ocorrência de aflatoxinas na cerveja

A ocorrência de aflatoxinas na cerveja foi relatada em estudos realizados em diferentes regiões do mundo (tabela 2). Os níveis mais altos de contaminação relatados são de países da África, referentes às cervejas artesanais preparadas com malte de sorgo (MATUMA *et al.*, 2013). Okuru *et al.* (2017) enfatizam que a grande incidência de fungos em países da África, principalmente no Quênia, é devido às condições climáticas favoráveis e à dificuldade de implantação das medidas de boas práticas agrícolas e de fabricação. Nos períodos de escassez de chuva ocorre uma significativa diminuição na produção do milho, conseqüentemente, alguns

produtores utilizam grãos de qualidade inferior para produzir a cerveja, tendo em vista que os grãos de melhor qualidade são destinados para a alimentação.

**Tabela 2** - Estudos que relatam a ocorrência de aflatoxina em cerveja em diferentes regiões.

Região de origem das cervejas (número de amostras)	Método analítico	Percentual de ocorrência (%) (>LOQ)	Concentração média/ faixa (ng.mL)	Autoria
Adis Adeba- <b>África</b> (18)	CLAE-FLU	38,9	3,52/1,23-12,47	Nigussie <i>et al.</i> , (2018)
Quênia - <b>África</b> (45)	ELISA e CLAE-MS/MS	100	3,5/1,8 -6,8	Okaru <i>et al.</i> , (2017)
Espanha (336); outros países da <b>Europa</b> (81)	CLAE-FLU	72,6	3,56/0,07-45,18	Burdaspal <i>et al.</i> , Lagarda (2013)
Malawai- <b>África</b> (9)	CLAE-MS	88,9	90/N.I.	Matumba <i>et al.</i> , (2014)
<b>Europa</b> (116)	CLAE-FLU	0	N.D.	Bertuzzi <i>et al.</i> , (2011)
<b>Europa</b> (117)	CLAE-MS/MS	115,1	N.I./15,4-31	Benezová <i>et al.</i> , (2012)
Malawi- <b>África</b> (5)	Fluorimetria	100	22,32/8,8-34,5	Matumba <i>et al.</i> , (2011)
Canadá- <b>América do Norte</b> (304) Outros países (36)	CLAE-FLU	2,66	0,0086/0,0007-0,23	Mably <i>et al.</i> ,(2005)
Japão- <b>Asia</b> (22); outros países (94)	CLAE-FLU	11,7	(N.I)/0,0012-0,066	Nakajima <i>et al.</i> , (1999)

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
 FLU detector de fluorescência  
 MS espectrometria de massas  
 MS/MS espectrometria de massa em série  
 ND Não detectado  
 NI Não informado

Os dados apresentados na tabela 2 demonstram que os níveis de contaminação em cervejas comercializadas em países da Europa são, expressivamente, inferiores aos relatados na África. Benezová *et al.* (2012) relataram que os níveis de aflatoxinas encontrados nas cervejas foram consideravelmente baixos, e assim, o risco de exposição às aflatoxinas devido ao consumo das cervejas estudadas é negligenciável. Burdaspal e Legarda (2013) encontraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os níveis de aflatoxinas nas cervejas com e sem milho na

composição, o valor mediano da contaminação por AFT nas amostras com milho (n=105) foi de 2,31 ng.L<sup>-1</sup>, enquanto nas cervejas sem milho (n=45) foi de 0,73 ng.L<sup>-1</sup>. Os autores ressaltam que o uso de adjuntos pode contribuir para ocorrência dessas toxinas na cerveja. Mably *et al.* (2005) investigaram a presença de aflatoxinas em cervejas comercializadas no México, incluindo também amostras importadas, os resultados mostraram que houve maior incidência de aflatoxinas em cervejas produzidas em países de clima quente. Até o momento, estudos acerca da ocorrência de aflatoxinas em cervejas comercializadas na América do Sul são escassos.

### 3.2.4 Transferência de aflatoxina da matéria-prima para a cerveja

Os pioneiros na investigação da transferência de aflatoxina da matéria-prima para a cerveja durante o processo de produção foram Chu *et al.* em 1975. Neste estudo, AFB<sub>1</sub> foi adicionada à cevada em duas concentrações, 1 µg.g<sup>-1</sup> e 10 µg.g<sup>-1</sup>, após as etapas do processamento foi realizada a determinação do teor de AFB<sub>1</sub>. Ao final da fervura do mosto, foi identificada uma recuperação de 40-49% e após a fermentação foi possível recuperar 45-55% da concentração inicial de AFB<sub>1</sub>. Após todas as etapas do processamento, houve recuperação de 18-27% de AFB<sub>1</sub> na cerveja. Esse estudo despertou o interesse acerca do processo de transferência das micotoxinas presentes na matéria-prima para a cerveja, e assim, demais pesquisadores realizaram trabalhos similares posteriormente. Entretanto, ainda não existe um consenso sobre a taxa de degradação das aflatoxinas após cada etapa do processo cervejeiro, mas é sabido que algumas fases do processamento têm maior influência na redução dos níveis devido aos processos de separação, como a filtração, e tratamentos térmicos.

A produção do malte pode ser considerada uma etapa crítica, pois ocorre o aumento da umidade e existe um tratamento térmico. Matumba *et al.* (2011) identificaram que os níveis de contaminação por aflatoxinas foram mais elevados no malte de sorgo do que no sorgo não maltado. Os autores relataram um aumento de até 39,3% da contaminação fúngica na etapa de germinação, isto pode ser devido aos seguintes fatores: contaminação cruzada com a água residual da maceração e aumento da reprodução dos fungos devido às condições de umidade (PASCARI *et al.*, 2018). O risco de aumento da contaminação por micotoxinas é ainda mais elevado em ambientes onde não há controle higiênico-sanitário adequado (MATUMBA *et al.*, 2014).

Okaye *et al.* (1987) realizaram uma investigação sobre a transferência de AFB<sub>1</sub> do milho para a cerveja na Nigéria e identificaram uma taxa de transferência de 41,38%. Enquanto, Pietre *et al.* (2010) realizaram um estudo avaliando a transferência de AFB<sub>1</sub> e fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) durante todas as etapas do processo de produção de cerveja feita com malte de cevada, e os resultados demonstraram uma recuperação de 1,5 % e 50%, respectivamente. De acordo com Pietre *et al.* (2010), a recuperação distinta entre AFB<sub>1</sub> e FB<sub>1</sub> é decorrente da diferença de solubilidade em água dessas micotoxinas. Os autores relatam que após a etapa de lavagem do malte e filtração do mosto houve uma redução significativa de 45% AFB<sub>1</sub> devido à sua baixa hidrosolubilidade.

Inoue *et al.* (2013) realizaram um estudo com o objetivo de verificar a transferência de 14 tipos de micotoxinas, incluindo as aflatoxinas, do malte para a cerveja após as etapas de trituração, filtração, fervura e fermentação. Os resultados demonstraram um decréscimo de 50% na concentração das micotoxinas após todas as etapas, sendo que houve considerável redução na concentração aflatoxinas após a fermentação. Inoue *et al.* (2013) discutem que isso pode ser devido à adsorção das micotoxinas ao material filtrado (grãos de malte triturados e leveduras) e à baixa solubilidade de algumas micotoxinas em água, como as aflatoxinas. O mecanismo de remoção das aflatoxinas no processo de fabricação da cerveja não é totalmente elucidado. Ruiz-Medina e Cordova (2015) discutem que não há completa remoção de AFB<sub>1</sub> durante a produção de cerveja e que pode haver conversão dessa toxina em produtos tóxicos desconhecidos, ressaltando a necessidade de estudos que investiguem essa conversão.

Pascari *et al.* (2018) discutem a transferência de micotoxinas em todas as etapas do processo cervejeiro. Os autores consideram que as etapas críticas para redução ou aumento nos níveis das aflatoxinas na fabricação de cerveja são a malteação (maceração e torrefação), fermentação e estabilização. Durante a fermentação pode ocorrer adsorção das micotoxinas na parede celular das leveduras por forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, e após a filtração do resíduo da fermentação pode ocorrer a redução das micotoxinas (CAMPAGNOLLO *et al.*, 2015). Um aspecto curioso da contaminação da cerveja por AFB<sub>1</sub> e deoxynivalenol (DON) é que pode provocar a diminuição na formação da espuma, pois, essas toxinas podem inibir a atividade da desidrogenase fazendo com que ocorra a diminuição dos níveis de dióxido de carbono que formam a espuma. Além disso, essa contaminação pode propiciar a formação de compostos indesejáveis durante a fermentação, como os acetaldeídos (REISS, 1973).

### 3.3 Métodos analíticos para determinação de aflatoxinas

Nos últimos anos, houve grande investimento no desenvolvimento de novos métodos para análise de aflatoxinas em alimentos e rações (PERNICA, 2019). Na cerveja, as aflatoxinas podem estar presentes em pequenas concentrações (níveis residuais), o que gera a necessidade de métodos com alta sensibilidade (RUIZ-MEDINA *et al.*, 2015; PASCARI *et al.*, 2018). As etapas de um método para análise de aflatoxinas em cerveja são a extração, limpeza/purificação, detecção e quantificação. É importante ressaltar que o preparo da amostra é uma etapa que consome bastante tempo e se não for feita de maneira adequada pode contribuir com o erro dos resultados.

#### 3.4.1 Extração e limpeza/purificação

O objetivo da extração é a remoção das aflatoxinas da matriz de maneira eficiente para não ocorra a co-extração de componentes com estrutura química semelhante que possam interferir na análise (PERNICA *et al.*, 2019). É necessário extrair o componente de interesse da matriz com eficiência para que a detecção e a quantificação possam ser realizadas de maneira eficiente, e a depender do tipo da matriz esse procedimento poderá ter maior complexidade (ELLIS *et al.*, 1991). A cerveja contém água, carboidratos, substâncias proteicas, sais minerais e etanol, podendo ser considerada uma matriz complexa (RUBERT *et al.*, 2013, PERNICA *et al.*, 2019). O álcool pode influenciar na extração das micotoxinas, e assim, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos de extração criteriosos (RUBERT *et al.*, 2013).

A escolha do solvente de extração adequado leva em consideração a solubilidade das aflatoxinas e a possibilidade de minimizar a extração de compostos interferentes. As aflatoxinas são solúveis em solventes ligeiramente polares e possuem pouca solubilidade nos solventes apolares, geralmente, são utilizados como solvente de extração uma mistura de solventes orgânicos como metanol, acetona e clorofórmio e água (ELLIS *et al.*, 1991). A adição de água ou de água acidificada na composição do solvente de extração, geralmente, é utilizada para otimização, a água proporciona melhor penetração do solvente na matriz e a solução ácida facilita na separação das toxinas dos outros constituintes da amostra (RAHMANI *et al.*, 2010).

A limpeza e a purificação têm como objetivo remover compostos que foram extraídos junto com as aflatoxinas para reduzir a ocorrência de interferentes no extrato final, e assim, minimizar o efeito matriz na etapa de identificação e quantificação (ELLIS *et al.*, 1991).

### 3.4.1.1 Extração líquido-líquido (ELL)

O método de extração líquido-líquido é baseado na diferença de solubilidade das aflatoxinas na fase orgânica e aquosa que são imiscíveis, e assim, ocorre a separação pelo princípio da partição (ELLIS *et al.*, 199; TURNER *et al.*, 2009). KHAN *et al.*, (2013) foram uns dos pioneiros a utilizar a extração líquido-líquido para purificação das aflatoxinas na cerveja com detecção realizada por UPLC-MS/MS, os resultados obtidos foram satisfatórios. Os autores enfatizam que o uso de acetato de etila como solvente de extração foi a melhor opção dentre os solventes testados, proporcionando uma recuperação de até 99%. A extração líquido-líquido tem como vantagens o baixo custo, a facilidade de aplicação e boa eficiência na extração (KHAN *et al.*, 2013). A desvantagem da extração líquido-líquido é o uso de grandes volumes de solventes nocivos ao meio ambiente, e assim, não é um método que segue as práticas sustentáveis e ecológicas preconizadas pela Química Verde (SAHA *et al.*, 2018). Outro aspecto negativo é a dificuldade de automação, fazendo com que a análise seja mais demorada (CALDAS *et al.*, 2011).

### 3.4.1.2 Extração em Fase Sólida (SPE)

O uso de extração em fase sólida (SPE – sigla para Solid Phase Extraction) teve início em meados da década 1970, o princípio básico desse método é o mesmo das técnicas cromatográficas, porém, apresenta maior simplicidade de aplicação (TURNER *et al.*, 2009; CALDAS *et al.*, 2011). A amostra aquosa é passada através do cartucho de SPE contendo um sorvente, responsável por reter os analitos, em seguida, é realizada a eluição. Existem diversos tipos de cartuchos de SPE, a fase quimicamente ligada pode ser polar, quando é utilizada a sílica, por exemplo, ou apolar como a C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub>, também chamada de fase reversa, dentre outras. Também podem ser utilizadas fases estacionárias com troca iônica e material de afinidade. Esse método possui a vantagem de poder ser utilizado como técnica de pré-concentração (CALDAS *et al.*, 2011). O uso da fase estacionária com material por imunoafinidade, como as colunas de imunoafinidade, apresentam resultados bastante satisfatórios devido à alta especificidade.

### 3.4.1.2.1 Coluna de imunoafinidade (CIA)

As colunas de imunoafinidade (CIA) foram desenvolvidas em meados da década de 1980 e seu uso provocou uma evolução na análise de micotoxinas em alimentos e rações (WILCOX *et al.*, 2015). Trata-se de um método imunoquímico utilizado para a limpeza e purificação e pode ser aplicado para diferentes matrizes (BERTUZZI *et al.*, 2011). A CIA é composta de um suporte no qual ficam imobilizados os anticorpos específicos em contato com uma solução tampão fosfato-salina (PBS). Este tem como finalidade manter o valor do pH constante para que não ocorra alteração das estruturas proteicas dos anticorpos ao entrar em contato com extratos de diferentes matrizes (OLIVEIRA, 2011). Quando o extrato da amostra é aplicado à coluna, ocorre a adsorção das aflatoxinas aos anticorpos e os demais componentes não são retidos (VICAM, USA). Para fazer a separação da ligação micotoxina-anticorpo, é usado um eluente que irá realizar a extração, no caso das aflatoxinas o eluente mais indicado é o metanol, pois apresenta menor agressividade aos anticorpos da CIA quando comparado com a acetonitrila e a acetona (VICAM, USA; BERTUZZI *et al.*, 2011).

As principais vantagens desse método são a alta especificidade e seletividade, removendo os interferentes da matriz com bastante eficiência, além disso, requer um curto intervalo de tempo para a análise (ZHAO *et al.*, 2016). Por outro lado, as colunas de imunoafinidade são projetadas para análise de um grupo específico de micotoxinas, o que dificulta a sua aplicação em métodos multiresíduos (KHAN *et al.*, 2013). A maior desvantagem desse método é o elevado custo das colunas (CASTILHO, 1996). SAHA *et al.*, (2018) relataram que o uso da CIA para matrizes complexas, como ervas, pode gerar a retenção de compostos com estrutura semelhante às aflatoxinas e assim fornecer um resultado falso positivo.

### 4.4.1.3 QuEChERS

O método QuEChERS foi desenvolvido por Anastassides em 2003 com intuito de oferecer uma alternativa prática e eficiente para a extração de agrotóxicos (PRESTES *et al.*, 2011). O termo é derivado da abreviação das palavras em inglês que indicam os atributos do método: rápido (quick), fácil (easy), barato (cheap), eficaz (effective), robusto (rugged) e seguro (safe) (MUSARURWA *et al.*, 2019). O método QuEChERS original é composto por três etapas: extração com acetonitrila, partição com a adição de sais e a limpeza em extração de fase sólida dispersiva (PRESTES *et al.*, 2011). Essas etapas são consideradas de simples execução e

promovem uma extração e limpeza eficientes. Com o desenvolvimento de novos estudos acerca do QueChERS, o método original sofreu algumas modificações para se adequar a diferentes necessidades de análise. Desse modo também, novas aplicações surgiram e essa técnica passou a ser utilizada para extração de outros analitos além dos agrotóxicos, como as micotoxinas. Os estudos que utilizaram o QueChRS para extração e purificação de aflatoxinas em cerveja são recentes. Zhao *et al.* (2017) e Gonzalez-Jartín *et al.* (2019) utilizaram esse método e os resultados são satisfatórios, boa sensibilidade e pouco efeito matriz.

Esse método possui as seguintes vantagens: é de fácil aplicação, necessita de quantidade reduzida de solvente, possui poucas etapas e tem boa eficiência (AZAIEZ *et al.*, 2014). Além disso, é possível fazer a análise de várias micotoxinas simultaneamente quando a detecção é feita por espectrometria de massas (PERNICA *et al.*, 2019). Rupert *et al.* (2013) realizaram um estudo usando o QueChERS para extrair simultaneamente 23 micotoxinas de comida de rua e a detecção por HPLC-MS/MS, os resultados foram bastante satisfatórios. Por outro lado, Ogendrarajah *et al.* (2013) relatam a ocorrência de efeito matriz no uso desse método para extração de micotoxinas em especiarias. A utilização de uma etapa de pré-concentração pode contribuir para melhor a eficiência do uso de QueChERS na análise (GONZÁLEZ-JARTÍN *et al.*, 2019).

### **3.4.2 Métodos de detecção e quantificação**

#### **3.4.2.1 Cromatografia líquida de camada delgada (CCD)**

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi um dos primeiros métodos usados para detectar aflatoxinas (ZHAO *et al.*, 2016). A CCD consiste em uma técnica de separação baseada, principalmente, no fundamento físico de adsorção (COLLINS, 2010) através da migração diferencial sobre o adsorvente disposto em uma camada delgada (ELLIS *et al.*, 1991, COLLINS *et al.*, 2010). As principais vantagens desse método são o baixo custo, praticidade e simplicidade de operação, mas tem como desvantagens os problemas de resolução e a baixa sensibilidade para a quantificação (GILBERT; VARGAS, 2003). Sendo assim, a concentração de aflatoxina na amostra irá determinar se a CCD é uma técnica adequada para a triagem em determinada aplicação. Os métodos de limpeza e purificação da amostra favoreceram consideravelmente a melhoria na identificação por CCD. Este método não necessita de muitos equipamentos e assim ainda é muito utilizado em países em

desenvolvimento que possuem instalações limitadas para o monitoramento de aflatoxinas (KOLOSOVA *et al.*, 2006).

#### **3.4.2.2 Enzima imuno ensaio (ELISA)**

O ELISA (Enzyme Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, no inglês) é considerado uma boa técnica de triagem para identificação de micotoxinas em alimentos e rações (BENEZOVA *et al.*, 2012). A detecção é feita mediante a interação específica entre o anticorpo e o antígeno, e os ensaios mais utilizados para análise de micotoxinas são o ELISA competitivo e o não competitivo. No método competitivo, o analito, no caso, as aflatoxinas da amostra irão competir com uma quantidade constante de aflatoxinas ligadas ao anticorpo específico, imobilizado na fase sólida, enquanto que no ensaio não competitivo, o anticorpo irá reagir de maneira proporcional a concentração de aflatoxina presente na amostra, e após essa etapa é realizada a detecção (MOTTA; DUARTE, 2010). Haverá uma alteração na coloração devido a ação da enzima presente reagindo com o substrato, gerando um pigmento. Essa variação é identificada por espectrofotometria ou comparação visual com um padrão (CHU, 1984).

O ELISA apresenta elevada sensibilidade e especificidade, principalmente quando são utilizados anticorpos monoclonais (MEIRELLES *et al.*, 2006). É um método prático, sendo possível a automação do ensaio o que permite a análise de grande número de amostras em um curto intervalo de tempo e apresenta baixo custo quando comparado com métodos tradicionais (OLIVEIRA, 2000). A desvantagem desse método é possibilidade de ocorrência de resultado falso positivo devido à reatividade cruzada (SOUZA *et al.*, 1999).

Apesar de não existirem muitos estudos que utilizaram ELISA para detecção de aflatoxinas em cerveja, este método tem sido muito usado na análise dessas micotoxinas em outras matrizes, apresentando resultados satisfatórios. Li *et al.*, (2009) enfatizaram que o uso do ELISA pode ser importante para monitoramento durante toda a cadeia produtiva, entretanto, essa técnica ainda não é aceita como método oficial.

#### **3.4.2.3 Dispositivos Eletrônicos Portáteis**

Dispositivos portáteis são uma alternativa aos métodos tradicionais para detecção de micotoxinas em alimentos e tem como principal vantagem a praticidade (GOUD *et al.*, 2016). Um biossensor é um dispositivo portátil capaz de realizar um reconhecimento biológico, por

nanomateriais, materiais inteligentes ou compostos biomiméticos (como os aptâmeros, por exemplo). A detecção é feita mediante um mecanismo de interpretação das propriedades elétricas, físico-químicas, óticas, dentre outras, com a interação entre o analito e o dispositivo (JIMÉNEZ; LEÓN, 2009). Os aptâmeros são moléculas sintéticas usadas para o reconhecimento molecular que oferecem vantagem quando comparadas com os anticorpos pois possuem maior afinidade e especificidade (GOUD *et al.* 2016).

Molina-Garcia *et al.*, (2012) avaliaram o desempenho de sensor por multi-comutação e por fluorescência induzida fotoquimicamente, do inglês photochemically induced fluorescence (PIF), para detecção de aflatoxina em cerveja, baseado no fotoproduto da fluorescência de AFB<sub>1</sub> por irradiação UV. Os resultados indicaram que esse método apresentou rapidez e eficiência tão boa quanto os métodos cromatográficos.

#### **3.4.2.4 Cromatografia Líquida**

A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica mais utilizada para análise de aflatoxinas em alimentos (RAHMANI *et al.*, 2009). Para esta finalidade, pode ser utilizada a cromatografia líquida em fase normal ou fase reversa, porém, a fase normal é mais utilizada pois oferece maior versatilidade de aplicação.

##### **3.4.2.4.1 Detecção por fluorescência**

Desde que as propriedades fluorescentes das aflatoxinas foram identificadas, ocorreu a promoção do desenvolvimento de métodos de detecção e quantificação baseados na emissão da fluorescência (CARNAGHAN *et al.*, 1964). Os detectores de fluorescência e UV são bastante utilizados para essa finalidade. Um problema recorrente dessa análise é que a emissão da fluorescência é influenciada pela composição da fase móvel (KOK, 1994). Em sistemas de cromatografia com fase normal ocorre a diminuição da fluorescência das espécies AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> e em sistemas de fase reversa a supressão da emissão é com as espécies AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> (KOK, 1994). Apesar da cromatografia em fase normal poder ser utilizada para separar as aflatoxinas, a mais comumente usada é a em fase reversa (JAIMEZ *et al.*, 2000). Os solventes que interferem na emissão da fluorescência são justamente os mais utilizados como fase móvel em sistemas de fase reversa para análise de aflatoxinas, que são a mistura de água-metanol e água-acetonitrila, principalmente quando há exposição a luz.

Com o intuito de aprimorar a detecção baseada no princípio da fluorescência, foram desenvolvidos métodos de derivatização, sendo que podem ser do tipo pré-coluna (reação com o ácido trifluoro-acético -TFA) e pós-coluna (reação com iodo, bromo e ciclodextrinas). A necessidade de derivatização pode ser considerada uma desvantagem da detecção por fluorescência, uma vez que consiste em uma etapa a mais, aumento do custo e uma possível fonte de erros, mas ainda assim essa técnica é bastante utilizada por ter alta especificidade e elevada sensibilidade.

A reação com TFA irá proporcionar a hidratação das ligações duplas da parte di-hidrofurano das AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> transformando-as em seus hemiacetais AFB<sub>2a</sub> e AFG<sub>2a</sub> que são altamente fluorescentes, essa reação não afeta AFG<sub>2</sub> e AFB<sub>2</sub> devido a sua estrutura saturada (KOK, 1994; JAIMEZ *et al.*, 2000). Geralmente, é realizada a adição do hexano antes do TFA para liberar as aflatoxinas dos resíduos cerosos remanescentes após a limpeza e purificação, mas esse solvente não interfere na reação com TFA. A reação ocorre com muita rapidez, cerca de 30 s, quando o TFA é adicionado puro, mas caso seja diluído em água o tempo médio é de 30 min a 50 °C. É comum realizar a evaporação do TFA para evitar um aumento excessivo no tamanho dos picos (KOK, 1994).

Um dos grandes problemas da derivatização com TFA é instabilidade dos compostos AFB<sub>2a</sub> e AFG<sub>2a</sub>, que faz com que haja a necessidade de realizar a reação de derivatização pouco tempo antes da análise e ainda assim pode ocorrer a interferência do solvente da fase móvel. O solvente usado para ressuspensão do resíduo de aflatoxinas também pode interferir na estabilidade dessas espécies, sendo que normalmente o metanol é evitado por favorecer a formação de acetatos metanoicos, e por esse mesmo motivo a proporção de metanol na fase móvel deve ser bem avaliada. Dois agravantes para a ocorrência de erros nessa etapa são a falta de controle do tempo da reação de derivatização que pode proporcionar falta de padronização e quando se faz análise de um número grande de amostras e estas ficam muito tempo no amostrador automático, podendo ocorrer deterioração (KOK, 1994; JAIMEZ *et al.*, 2000).

Um dos métodos de derivatização pós-coluna mais utilizado é através da reação com halogênios, o iodo ou o bromo. A reação com o iodo foi estabelecida como método oficial AOAC e IUPAC. Quando o iodo está em solução aquosa ocorre a liberação dos átomos de grupamentos metoxi que são adicionadas as ligações duplas de AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>, essa reação é capaz de aumentar a emissão da fluorescência de AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> de 25 a 50 vezes e não ocorre alteração na concentração de AFG<sub>2</sub> e AFB<sub>2</sub> (JAIMEZ *et al.*, 2000). As desvantagens de usar o iodo como agente derivatizante são a sua alta instabilidade, necessidade de preparo diário das

soluções de trabalho, possibilidade de corrosão dos componentes de vedação da bomba e entupimento dos capilares caso haja precipitação (JAIMEZ *et al.*, 2000).

O bromo é um agente oxidante tão potente quanto o iodo, mas possui uma maior instabilidade, sendo necessária a utilização de uma célula eletroquímica, chamada de Kobra, na qual a partir do sal brometo ocorre a produção do bromo constantemente. Uma das vantagens do uso do bromo quando comparado ao iodo é o menor custo e a maior praticidade (KOK, 1994).

Existem estudos que demonstram a eficiência das ciclodextrinas na formação de complexos com as AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>, proporcionando alta emissão de fluorescência. O uso desse método apresenta resultados similares ao da derivatização com halogênios, entretanto também existe o problema da instabilidade.

Em suma, a cromatografia líquida acoplada ao detector de fluorescência (HPLC-FLU) tem se mostrado um método eficiente para detecção de aflatoxina em cerveja (BURDASPAL e LAGARDA, 2003; BÉLTRAN *et al.*, 2011).

#### **3.4.2.4.2 MS/MS**

A cromatografia acoplada a espectrometria de massas é considerada padrão ouro na identificação e quantificação de contaminantes em alimentos, incluindo a análise de aflatoxinas (ZHAO *et al.*, 2016). Essa forma de detecção permitiu o desenvolvimento de métodos de análise multiresíduos, favorecendo assim a detecção simultânea de diversas micotoxinas (RURPERT *et al.*, 2013; BELOGLAZOVA *et al.*, 2015). A maioria dos estudos que investigaram a ocorrência de aflatoxina em cerveja utilizaram a espectrometria de massas para identificação (Tabela 3). Entretanto, o custo do equipamento de espectrometria de massas é elevado e nem todos os laboratórios possuem recursos para a aquisição. É possível observar no estudo realizado por Bertuzzi *et al.*, (2011) que usou o detector de fluorescência como método de detecção, resultados de sensibilidade similares aos encontrados nas pesquisas que utilizaram a espectrometria de massas. Esse método apresenta a vantagem de não precisar de derivatização (RAHMANI *et al.*, 2009).

A tabela 2 apresenta um compilado de métodos analíticos que usaram diferentes técnicas preparativas e sistemas de detecção. Nela são apresentados os dados de sensibilidade em recuperação.

### 3.5 Avaliação de risco

A avaliação de risco tem o objetivo de estimar a probabilidade da ocorrência de efeito adverso quando há exposição humana a substâncias potencialmente tóxicas, e assim, esse procedimento pode ser utilizado para avaliação da exposição às aflatoxinas (IPCS, 2009). O método para a determinação da avaliação de risco pode ser dividido em quatro etapas: identificação do dano (ou perigo), caracterização da relação dose resposta, avaliação da exposição e caracterização do risco (JARDIM; CALDAS, 2009). A etapa de identificação consiste em averiguar a natureza do efeito adverso causado pela exposição à substância. Em seguida, é realizada a caracterização da relação dose-resposta através da avaliação da relação quantitativa da exposição e a incidência da resposta de um efeito adverso. A avaliação da exposição consiste na estimativa da ingestão provável de substâncias tóxicas. Essa avaliação é feita mediante os dados de consumo do alimento analisado, concentração da substância no alimento e peso corpóreo médio da população estudada. Por fim, é realizada a caracterização do risco, na qual estima-se a probabilidade da ocorrência do efeito adverso na população exposta (ANDRADE, 2016).

A toxicidade da substância estudada irá influenciar na escolha da metodologia indicada para caracterização do risco. As aflatoxinas são classificadas como substâncias carcinogênicas para seres humanos, segundo a IARC (2012). A caracterização do risco para substâncias carcinogênicas e genotóxicas pode ser feita de acordo com duas metodologias: (i) o princípio ALARA (as low as reasonably achievable), refere-se à possibilidade de reduzir a exposição ao nível mais baixo que seja possível; (ii) o cálculo da Margem de Exposição (MOE sigla do termo em inglês: Margin of Exposure). A MOE é calculada através da razão entre a referência toxicológica e a exposição, o valor obtido dessa razão é utilizado para caracterizar o risco.

O valor da MOE é inversamente proporcional ao risco de exposição. A MOE igual ou superior a 10000 caracteriza baixo risco e valores inferiores a 10000 indicam que há um risco de exposição carcinogênico do contaminante analisado. Valores da MOE inferiores a 125, indicam que além dos efeitos carcinogênicos, deve-se ter a preocupação com relação aos efeitos neurotóxicos (ESPOSITO *et al.*, 2017).

Alguns estudos realizaram caracterização do risco de exposição às aflatoxinas devido ao consumo de cerveja. Okaru *et al.* (2017) encontraram uma MOE de 16 referente ao consumo elevado de cerveja artesanal no Quênia. Essa caracterização do risco revela elevada chance de exposição às aflatoxinas com efeitos carcinogênicos e neurotóxicos. Não é de nosso

conhecimento a existência dados sobre a caracterização do risco de exposição às aflatoxinas devido ao consumo de cerveja no Brasil. A realização da avaliação de risco é muito importante, pois considera os dados de consumo específicos da população estudada. Essas informações podem contribuir para que as autoridades competentes possam estabelecer limites máximos tolerados para os níveis de aflatoxinas em cerveja.

**Tabela 3** - Métodos analíticos para determinação de aflatoxina em cerveja.

Limpeza e extração	Deteção e quantificação	LD (ng.mL <sup>-1</sup> )	REC (%)	Referência
QueChRES	UPLC-MS/MS	0,002-0,004	70	GONZÁLEZ-JARTÍN <i>et al.</i> , 2019
ELL	HPLC-MS/MS	1,3-205	98-100	ADEKOYA <i>et al.</i> , (2018)
ELL	HPLC-MS/MS	1,16-3,22	N.I.	PASCARI <i>et al.</i> , 2018
ELL	ELISA e HPLC-MS/MS	0,1	N.I.	OKARU <i>et al.</i> , 2017
QueChRES	LC-MS/MS**	0,03	92,7-103,6	ZHAO <i>et al.</i> , 2017
ELL	Dispositivo portátil	0,19-0,27	92-102	GOUD <i>et al.</i> , 2016
CIA	HPLC-FLU	0,05-0,09	90,8-100,8	BURDASPAL E LEGARDA, 2013
SPE (C18)	UHPLC-MS/MS	1,1-2,9*	96,6-100	MATUMBA <i>et al.</i> , 2014
SPE	HPLC-QqQ-MS/MS	0,3	63-91%	RUPERT <i>et al.</i> , 2013
ELL	UPLC-MS / MS	0,001-0,0003	85-96	KHAN <i>et al.</i> , (2013)
SPE	Sensor ótico	0,029	94-106	MOLINA-GARCÍA <i>et al.</i> , 2012
CIA	HPLC-MS	0,0015-0,0047	96,8-106	BENEZOVÀ <i>et al.</i> , 2012
CIA	HPLC-FLU	0,0005-0,0010	92,3-95,8	BERTUZZI <i>et al.</i> , (2011)
CIA	Fluorimetria	2	N.I.	MATUMBA <i>et al.</i> , (2011)
CIA	HPLC-FLU	0,0005-0,0010	95,5-101,2	NAKAJIMA <i>et al.</i> , (1999)

N.I. Não informado; \*\*Analisou apenas AFB<sub>1</sub>

ELL Extração líquido-líquido

SPE Extração em fase sólida

CIA Coluna de imunoafinidade

### 3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma questão inconclusiva acerca da ocorrência de aflatoxinas em cerveja é o mecanismo de eliminação e conversão dessas toxinas durante o processo cervejeiro. Não há consenso com relação a taxa de redução e sobre os fatores que podem influenciar nesse processo. Sendo assim, estudos que investiguem essa questão podem ser bastante relevantes. O estado da arte sobre os métodos de determinação de aflatoxina em cerveja revela uma crescente preocupação com o desenvolvimento de métodos que estejam de acordo com princípios da Química Verde, gerando menor volume de resíduos tóxicos. O método de extração/purificação de aflatoxinas em cerveja mais utilizado é coluna de imunoafinidade, pois apresenta resultados satisfatórios de especificidade e seletividade, contribuindo com a elevada sensibilidade da análise. O QueChERS tem sido relatado como um método promissor, porém, não há muitos dados na literatura que utilizaram essa técnica para purificação de aflatoxina em cerveja. A detecção e a quantificação são comumente realizadas por HPLC-FLU ou HPLC-MS/MS. A análise dos dados de validação, dos estudos que utilizaram esses dois métodos de análise, revela que os resultados de sensibilidade e precisão dos estudos que utilizaram a detecção por fluorescência são comparáveis aos que utilizam a detecção por espectrometria de massas. A determinação de aflatoxinas por ELISA e pelos detectores portáteis tem sido bastante utilizada como métodos de triagem e oferece a vantagem da praticidade e baixo custo, podendo ser uma importante ferramenta no monitoramento de aflatoxinas em toda a cadeia produtiva.

## REFERÊNCIAS

- ABARCA, M L. *et al.* Mycotoxin producing fungi. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 17, n. 2, p. S63-8, 2000.
- ABRAMSON, D. *et al.* Mycotoxin formation in hulless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content. **Journal of Stored Products Research**, v. 35, n. 3, p. 297-305, 1999.
- AMARAL, K. A. S. *et al.* Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.
- APPLEBAUM, R. S. *et al.* Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products-a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 8, p. 752-777, 1982.
- ARAÚJO, G. S. Elaboração de uma cerveja ale utilizando melão de caroá [sicana odorífera (vell.) naudim] como adjunto do malte. **Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**. Universidade Federal da Bahia. 2016.
- ARDIC, M. *et al.* Determination of aflatoxin B1 levels in deep-red ground pepper (isot) using immunoaffinity column combined with ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 1596-1599, 2008.
- AZAIEZ, I. *et al.* Multi-mycotoxins analysis in dried fruit by LC/MS/MS and a modified QuEChERS procedure. **Food analytical methods**, v. 7, n. 4, p. 935-945, 2014.
- BELOGLAZOVA, N. V.; EREMIN, S. A. Rapid screening of aflatoxin B1 in beer by fluorescence polarization immunoassay. **Talanta**, v. 142, p. 170-175, 2015.
- BENEŠOVÁ, K. *et al.* Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 626-630, 2012.
- BENNETT, J. W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. 1987.
- BENTO, L. F. *et al.* Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 1, p. 44-49, 2012.
- BERTUZZI, T. *et al.* Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. **Food control**, v. 22, n. 12, p. 2059-2064, 2011.

BLOUNT, W. P. Turkey “X” disease. **Turkeys**, v. 9, n. 2, p. 52-55, 1961.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 65, de 16 de dezembro de 2009. Diário Oficial da União, Brasília, 17 de dezembro de 2009a. Seção 1, p.19-20.

BRASIL. RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. 2011.

BRIGGS, D. E. *et al.* Brewing: Science and Practice. 1 st ed. England: Woodhead Publishing, 2004.

BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. Survey on aflatoxin in beer sold in Spain and other European countries. **World mycotoxin journal**, v. 6, n. 1, p. 93-101, 2013.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CALDAS, S. S. *et al.* Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CAMPAGNOLLO, F. B. *et al.* In vitro evaluation of the ability of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* to bind mycotoxins. **Food Research International**, v. 77, p. 643-648, 2015.

CARNAGHAN, R. B. A. Fungi in Human and Animal Disease: Some Biological Effects of Aflatoxin. 1964.

CARVALHO, L. G. Dossiê Técnico: Produção de Cerveja. **Rio de Janeiro, REDETEC Rede Tecnológica do Rio de Janeiro**, 2007.

CASTILHO, M. C. Resíduos de Hormonas Anabilizantes: Estudos de Metodologias analíticas multiresíduos. Coimbra: Faculdade de Farmácia. Tese de Doutorado. 1996.

CERVESIA. O mercado cervejeiro brasileiro atual – potencial de crescimento. 2011. Disponível em: [www.cervesia.com.br/](http://www.cervesia.com.br/) . Acesso em 18 de maio de 2020.

- CHU, F. S. *et al.* Stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A in brewing. **Applied microbiology**, v. 29, n. 3, p. 313-316, 1975.
- COBOS, Christopher J. *et al.* Employing Peanut Seed Coat Cell Wall Mediated Resistance Against *Aspergillus flavus* Infection and Aflatoxin Contamination. **Preprints**. 2018.
- COLEN, L.; SWINNEN, J. F.M. Beer Drinking Nations-The Determinants of Global Beer Consumption. 2010.
- COLLINS, C. H. O desenvolvimento da cromatografia em camada delgada. **Science Crhomatografica**, p. 5-12, 2010.
- CURI, R. A. Produção de cerveja utilizando cevada como adjunto de malte. **Tese de doutorado**. Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP. 2006.
- D'AVILA, R. F. *et al.* Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 2, p. 60-68, 2012.
- DE PAULA SANTOS, S. **Os primórdios da cerveja no Brasil**. Atelie Editorial, 2003.
- ELLIS, W. O. *et al.* Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 403-439, 1991.
- ESPOSITO, F., NARDONE, A., FASANO, E., TRIASSI, M., CIRILLO, T. (2017). Determination of acrylamide levels in potato crisps and other snacks and exposure risk assessment through a Margin of Exposure approach. **Food and Chemical Toxicology**, 108, 249-256.
- FERREIRA, H. *et al.* Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Ambiência**, v. 2, n. 1, p. 113-127, 2006.
- FINK-GRERNMELS, J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. **Veterinary Quarterly**, v. 21, n. 4, p. 115-120, 1999.
- FONSECA, H. Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) na região araraquarense, do estado de São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 32, p. 7-19, 1975.

GERBALDO, G. A. *et al.* Surveillance of aflatoxin and microbiota related to brewer's grain destined for swine feed in Argentina. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2011.

GILBERT, J.; VARGAS, E. A. Advances in sampling and analysis for aflatoxins in food and animal feed. **Journal of toxicology: toxin reviews**, v. 22, n. 2-3, p. 381-422, 2003.

GOLDBLATT, L. A. Learning to live with mycotoxins: aflatoxin—a case history. In: **Control of Mycotoxins**. Butterworth-Heinemann, 1973. p. 223-CP2.

GONG, Y. Y.; WATSON, S.; ROUTLEDGE, M. N. Aflatoxin exposure and associated human health effects, a review of epidemiological studies. **Food safety**, v. 4, n. 1, p. 14-27, 2016.

GONZÁLEZ-JARTÍN, J. M. *et al.* A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer. **Food chemistry**, v. 275, p. 703-710, 2019.

GOUD, K. Y. *et al.* Disposable and portable electrochemical aptasensor for label free detection of aflatoxin B1 in alcoholic beverages. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 235, p. 466-473, 2016.

HAYES, A. W.; WILLIAMS, W. L. Acute toxicity of aflatoxin B1 and rubratoxin B in dogs. **Journal of environmental pathology and toxicology**, v. 1, n. 1, p. 59-70, 1978.

HENRY, S. H.; BOSCH, F. X.; BOWERS, J. C. Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks. In: **Mycotoxins and food safety**. Springer, Boston, MA, 2002. p. 229-233.

IARC. 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances, food items and constituents. Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Vol. 56. Lyon (France): World Health Organization; p. 397–444.

IARC. 2002. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and sryrene. *Int Agency Res Cancer*. 82:171–300.

IARC. 2012. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 100F:224–248.

INOUE, T. *et al.* Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, p. 130027, 2013.

International Programme on Chemical Safety (IPCS), 2009. Environmental health criteria 240 – principles and methods for the risk assessment on chemicals in food. Disponível em: <http://tinyurl.com/pscggglx>.

JAIMEZ, J. *et al.* Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, n. 1-2, p. 1-10, 2000.

JANIĆ HAJNAL, E. *et al.* Aflatoxins contamination of maize in Serbia: The impact of weather conditions in 2015. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 34, n. 11, p. 1999-2010, 2017.

JIMÉNEZ, C. *et al.* Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. **Vitae**, v. 16, n. 1, p. 144-154, 2009.

KATSURAYAMA, A. M.; TANIWAKI, M. H. Fungos e aflatoxinas no arroz: ocorrência e significado na saúde do consumidor. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

KAWASHIMA, L. M. Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil. **Tese de doutorado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. 2004.

KAWASHIMA, L. M.; VALENTE SOARES, L. M. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

KELLER, L. A. M. *et al.* Micobiota e Micotoxinas em Resíduo Úmido de Cervejaria. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária.**, v 31, n 4, p. 247-252, 2009.

KHAN, Mohammad R. *et al.* Analysis of aflatoxins in nonalcoholic beer using liquid–liquid extraction and ultraperformance LC-MS/MS. **Journal of separation science**, v. 36, n. 3, p. 572-577, 2013.

KOK, W. T. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 659, n. 1-2, p. 127-137, 1994.

KOLOSOVA, A. Y. *et al.* Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B 1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 384, n. 1, p. 286-294, 2006.

KWIATKOWSKI, A.; DE FARIA ALVES, A. P. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 2, n. 2, 2007.

LIU, Y.; WU, F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 6, p. 818-824, 2010.

MABLY, M. *et al.* Survey of aflatoxins in beer sold in Canada. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 12, p. 1252-1257, 2005.

MACHINSKI JR, M. *et al.* Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 10, p. 1001-1007, 2001.

MATUMBA, L. *et al.* A limited survey of mycotoxins in traditional maize based opaque beers in Malawi. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 253-256, 2014.

MATUMBA, L. *et al.* Aflatoxins in sorghum, sorghum malt and traditional opaque beer in southern Malawi. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 266-268, 2011.

MEGA, J. F.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. A. produção de cerveja no Brasil. **Revista Citino**, v. 1, n. 1, p. 34-42, 2011.

MEIRELLES, P. G. *et al.* Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 613-627, 2006.

MOLINA-GARCÍA, L.; CÓRDOVA, M. L. F.; RUIZ-MEDINA, A. Indirect determination of aflatoxin B1 in beer via a multi-commuted optical sensor. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 3, p. 392-402, 2012.

MOTTA, T. P.; DUARTE, K. M. R. ELISA na detecção de aflatoxinas em alimentos. **Pubvet**, v. 4, p. Art. 986-991, 2010.

MUSARURWA, H. *et al.* Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 103314, 2019.

NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 4, p. 897-902, 1999.

NEWBERNE, P. M.; BUTLER, W. H. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. **Cancer research**, v. 29, n. 1, p. 236-250, 1969.

OKARU, A. O. *et al.* Aflatoxin contamination in unrecorded beers from Kenya—A health risk beyond ethanol. **Food Control**, v. 79, p. 344-348, 2017.

OKOYE, Z. S. C. Stability of zearalenone in naturally contaminated corn during Nigerian traditional brewing. **Food Additives & Contaminants**, v. 4, n. 1, p. 57-59, 1987.

OLIVEIRA, C. A. F. de; 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.

OLIVEIRA, C. A. F. *et al.* Immunochemical assessment of aflatoxin M1 in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. **Food Additives & Contaminants**, v. 14, n. 1, p. 7-10, 1997.

OMS. Global status report on alcohol and health 2018. Genebra, Suíça: Organização Mundial da Saúde, 2018a.

PASCARI, X. *et al.* Survey of mycotoxins in beer and exposure assessment through the consumption of commercially available beer in Lleida, v. 92, p. 87-91, 2018.

PATRIARCA, A.; PINTO, V. F. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 50-60, 2017.

- PEÑA, D. G. La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. **Salud pública de México**, v. 49, n. 3, p. 227-235, 2007.
- PERAICA, M. *et al.* Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 9, p. 754-766, 1999.
- PEREYRA, M. G. A. *et al.* Fungi and selected mycotoxins from pre-and postfermented corn silage. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 4, p. 1034-1041, 2008.
- PERNICA, M. *et al.* Analytical techniques for determination of mycotoxins in barley, malt and beer: A review. **Kvasny Prumysl**, v. 65, n. 2, p. 46-57, 2019.
- PERNICA, Marek *et al.* Analytical techniques for determination of mycotoxins in barley, malt and beer: A review. **KVASNY PRUMYSL**, v. 65, n. 2, p. 46-57, 2019.
- PIACENTINI, K. C. *et al.* Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer quality. **Food chemistry**, v. 218, p. 64-69, 2017.
- PIETRI, A. *et al.* Transfer of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 10, p. 1431-1439, 2010.
- PLEADIN, J.; FRECE, J.; MARKOV, K.. Mycotoxins in food and feed. **Advances in food and nutrition research**, v. 89, p. 297-345, 2019.
- PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.
- RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Validation of the procedure for the simultaneous determination of aflatoxins ochratoxin A and zearalenone in cereals using HPLC-FLD. **Food additives & contaminants: part a**, v. 27, n. 12, p. 1683-1693, 2010.
- RAMOS, C. R. B. A.; BRASIL, E. M.; GERALDINE, R. M. Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivados em três regiões do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n. 2, p. 95-102, 2008.

RASCH, C.; BÖTTCHER, M.; KUMKE, M. Determination of aflatoxin B 1 in alcoholic beverages: comparison of one-and two-photon-induced fluorescence. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, n. 1, p. 87-92, 2010.

REISS, J. Influence of the mycotoxins aflatoxin B 1, rubratoxin B, patulin and diacetoxyscirpenol on the fermentation activity of baker's yeast. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 51, n. 4, p. 337-345, 1973.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2002.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A química da cerveja. **Revista Química Nova**, v. 37, p. 98-105, 2015.

RUIZ-MEDINA, A.; FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, M. L. Aflatoxin B1 in beer at different stages of production. In: **Processing and Impact on Active Components in Food**. Academic Press, 2015. p. 517-523.

SACRAMENTO, T. R. Importância da Contaminação de Alimentos por Aflatoxinas para a Incidência de Câncer Hepático. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p. 141-169, 2016.

SAHA, A. *et al.* High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous detection of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Indian medicinal herbs using QuEChERS-based extraction procedure. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 98, n. 7, p. 622-643, 2018.

SANTIN, E. *et al.* Low level of aflatoxin in broiler at experimental conditions. **Use of cell wall yeast as adsorbent of aflatoxin: Archives of Veterinary Science**, 2005.

SARMA, U. P. *et al.* Aflatoxins: implications on health. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 124-133, 2017.

SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G. A. Determination of aflatoxins in beer. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 6, p. 1229-1234, 1997.

SILVA, J. O.; CÂNDIDO, L. M. B.; NOVELLO, D. Ocorrência de aflatoxinas em arroz consumido por militares do exército brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1238-1244, 2008.

SIMAS, M. M. S. *et al.* Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 404-408, 2007.

SIMIONATO, E. M. R. S.; ASTRAY, R. M.; SYLOS, CÉLIA M. de. Ocorrência de ocratoxina A e aflatoxinas em arroz. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 2, p. 123-30, 2003.

SIMONATO, E. M. R.; MENEZES, M. L.; Determinação de ocratoxinas em cervejas, por injeção direta da amostra empregando uma coluna cromatografica IS-aniônica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 3, p. 234-239, 2007.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA - SINDICERV. Mercado. Disponível em: [www.sindicerv.com.br/](http://www.sindicerv.com.br/). Acesso em 10 de maio de 2020

SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M. A.; MACEDO, G. A. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 4, p. 491-498, 2009.

SLEIMAN, M. *et al.* Determinação do percentual de malte e adjuntos em cervejas comerciais brasileiras através de análise isotópica. **Ciência e agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 163-172, 2010.

SMITH, L. E. *et al.* Aflatoxin exposure during pregnancy, maternal anemia, and adverse birth outcomes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 96, n. 4, p. 770-776, 2017.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, Alan DW. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International journal of food microbiology**, v. 43, n. 3, p. 141-158, 1998.

TABATA, S. *et al.* Fate of aflatoxins during cooking process and effect of food components on their stability. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, v. 33, n. 2, p. 150-156, 1992.

TRINDER, D. W. A survey of aflatoxins in industrially brewed South African sorghum beer and beer strainings. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 94, n. 5, p. 307-309, 1988.

TSCHOPE, E. C. *Microcervejarias e cervejarias: a história, a arte e a tecnologia*. São Paulo: Aden, 2001.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica chimica acta**, v. 632, n. 2, p. 168-180, 2009.

URREGO NOVOA, J. R.; DÍAS, G. J. Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina*, 2006.

VARGAS, E. A. *et al.* Co-occurrence of aflatoxins B 1, B 2, G 1, G 2, zearalenone and fumonisin B 1 in Brazilian corn. **Food Additives & Contaminants**, v. 18, n. 11, p. 981-986, 2001.

VENTURINI FILHO, W. G. *Bebidas Alcoólicas*, 2. ed. [s.1] Blucher, 2016.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. **Aquarone, E, Borzani, W, Schmidell, W, Lima, UA. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, p. 91-144, 2001.

VENTURINI, W. G.. **Tecnologia de cerveja**. Funep, 2000.

WILCOX, J. *et al.* The use of immunoaffinity columns connected in tandem for selective and cost-effective mycotoxin clean-up prior to multi-mycotoxin liquid chromatographic–tandem mass spectrometric analysis in food matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1400, p. 91-97, 2015.

WILLIAMS, J. H. *et al.* Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 5, p. 1106-1122, 2004.

WU, F. Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. **World Mycotoxin Journal**, v. 8, n. 2, p. 137-142, 2015.

## ***Capítulo II***

---

***Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in beers produced in Brazil and their carcinogenic risk evaluation***

## **Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in beers produced in Brazil and their carcinogenic risk evaluation**

**Andrea Rebouças Rocha<sup>a</sup>, Mariana Silva Cardoso<sup>b</sup>, José Antônio Souza Júnior<sup>c</sup>, Erival Amorim Gomes Júnior<sup>a</sup>, Leonardo Fonseca Maciel<sup>a</sup>, José Antonio Menezes-Filho<sup>a, b, c</sup>**

<sup>a</sup> Graduate Program in Food Science, College of Pharmacy, Federal University of Bahia;

<sup>b</sup> Graduate Program in Pharmacy, College of Pharmacy, Federal University of Bahia;

<sup>c</sup> Laboratory of Toxicology, College of Pharmacy, Federal University of Bahia.

**Corresponding author:** José A. Menezes-Filho, College of Pharmacy, Federal University of Bahia. Rua Barão de Jeremoabo 137. Campus Universitário de Ondina. Salvador, Bahia. Zip-code: 40170-115. Brazil. E-mail: [antomen@ufba.br](mailto:antomen@ufba.br).

### **Highlights:**

- Aflatoxins were determined in beer samples with and without adjuncts by HPLC-Fl.
- AFB2 above method's LOQ were found in all beer samples.
- High male intake of pure malt beers is more prone to an increased carcinogenic risk.

## ABSTRACT

The aflatoxins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub>) were investigated in 60 beer samples of the leading commercial beer brands, with and without adjuncts, produced in Brazil. An analytical method was standardized and validated by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. The extraction was carried out using immunoaffinity columns. The limit of quantification (LOQ) ranged from 10 to 30 ng.L<sup>-1</sup>, and the mean recoveries were 88.5%, 98.0%, 98.3%, and 110.1% for AFB<sub>1</sub> and AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, and AFG<sub>2</sub>, respectively. The percentage of samples positive for total aflatoxins (AFT) was 100% for beers with adjunct and 80% for beers without adjunct ("pure malt"). Of the total beer samples, 88.3% showed the occurrence of at least one of the aflatoxins. AFB<sub>2</sub> had the highest incidence in the beer samples, with the highest contamination level with adjuncts. The median levels of AFB<sub>2</sub> were 27.0 and 40.4 ng.L<sup>-1</sup> for the group of beers with and without adjunct, respectively. Among the positive samples, the median value for AFT and AFB<sub>1</sub> were 40.9 and 16 ng.L<sup>-1</sup>, respectively. Carcinogenic risk characterization was performed for exposure to AFB<sub>2</sub> and AFT by estimating the margin of exposure (MOE). The MOE in scenario 2, corresponding to high beer consumption (> 160 mL/day), was 5,303 for a beer with adjunct and 3,643 for beer without adjunct. In summary, the results found in this study demonstrate that elevated beer consumption may pose a risk of exposure to the carcinogenic effects of aflatoxins, especially AFB<sub>2</sub>. The consumption of pure malt beers produced and commercialized in Brazil represents an even higher risk than the consumption of beer with added adjuncts. This fact alone requires further investigation since it may suggest that the barley from which the malt is produced may contribute to the occurrence of aflatoxins in beer, at least in Brazil.

**Keywords:** Aflatoxins; Beer; Carcinogenic Risk; Immunoaffinity Column; HPLC.

## 1. Introduction

The fungi *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius* produce the aflatoxins B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), and G<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), which are compounds derived from difuranocoumarin. The nomenclatures B and G are derived from the initial letters of blue and green fluorescent colors produced under UV radiation (Sweeney and Dobson, 1998). The chemical structure of aflatoxins confers high thermostability, especially when interacting with the food matrix (Pascari et al., 2018). Therefore, heat treatments with high temperatures, at least 160 °C, are necessary to eliminate them from the food (Raters and Matissek, 2008). These contaminants are highly toxic and present a significant threat to human and animal health, given their carcinogenic, teratogenic, and mutagenic potential (Pleadin et al., 2019). They are classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as belonging to group I, compounds that are carcinogenic to humans (IARC, 2012).

Diet is considered the main route of exposure to naturally occurring carcinogens (Khan et al., 2012). Aflatoxins contaminate a wide variety of essential agricultural products, including corn, wheat, peanuts, rice, spices, dried fruits, and nuts (Khayoon et al., 2010). Among the commonly contaminated grains are those used as raw materials and adjuncts for beer, such as barley, corn, wheat, and oats (Piacentini et al., 2015; Piacentini et al., 2018). Due to their high thermal stability, aflatoxins can be transferred from the raw material to the beer (Chu et al., 1975; Okaye et al., 1987; Pietri et al., 2010; Inoue et al., 2013). CHU et al., (1975) found a transfer rate of AFB<sub>1</sub> ranging from 18 to 27%, while Okoye et al., (1987) identified the transfer of 41.4% of AFB<sub>1</sub> content from corn to beer. However, Pietri et al. (2010) observed a recovery in beer of 1.5% of the initial AFB<sub>1</sub> concentration present in barley malt. There is no consensus regarding the aflatoxin contents that can be transferred from raw material to beer, but it is known that there is no complete elimination (Ruiz-Medina and Cordova et al., 2015).

Given the need to evaluate the occurrence of aflatoxins in beers, studies have been conducted in different regions of the world: countries in Europe (Benezová et al., 2012; Bertuzzi et al. 2011; Burdaspal and Legarda 2013), Africa (Matumba et al., 2014, Okaru et al. 2017; Nigussie et al., 2018), Japan (Nakajima et al. 1999) and Canada (Mably et al., 2005). However, despite the theme's relevance, especially for its direct impact on the population's health, there are little data on the occurrence of aflatoxins in beers produced and commercialized in Brazil, although beer is the most consumed alcoholic beverage by Brazilians (WHO, 2019).

The first law on beer quality was the German Beer Purity Law which established that this beverage should be produced with only three ingredients: water, malt, and hops (Venturini,

2000). In Brazil, according to decree n<sup>o</sup>. 9,902 of 2019, beer is the beverage obtained by the alcoholic fermentation of malted barley wort or malt extract, previously submitted to a cooking process added hops or hop extract. Part of the barley malt may be replaced by brewing adjuncts, alternative sources of fermentable carbohydrates, such as corn, rice, rye, and sorghum. Decree No. 6871 (BRASIL, 2009) states that the addition of adjuncts cannot exceed 45% of the original extract. However, this paragraph was revoked after decree no 9,902 (BRASIL, 2019). This limit is also provided by Normative Instruction No. 54 of the Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (MAPA). The retraction of the paragraph stating the maximum limit of adjuncts that can be added may generate ambiguity in interpreting these guidelines regarding the maximum proportion of adjuncts in beer.

The use of adjuncts offers advantages to the beer production process. One of the main advantages is the reduction of costs because countries that do not produce barley on a large scale need to export this grain, leading to increased costs with one of the primary raw materials of this beverage (Sleiman et al., 2010). Thus, using grains such as corn and rice, produced on a large scale in Brazil, offers lower production costs. In addition, the use of adjuncts accelerates the fermentation process and provides different aromas and flavors to the beer (Sleiman et al., 2010; D'Avila et al., 2012; Piacentini et al., 2017).

On the other hand, adjuncts can contribute to aflatoxins in beer due to the high incidence of these toxins in the main grains used as adjuncts, such as corn, rice, and wheat (Burdaspal and Legarda et al., 2013). It is worth commenting that in developing countries, such as Brazil, the higher quality grains are destined for export, while the medium quality grains go for domestic consumption, and the rest is destined for the production of beer adjuncts (Leslie and Logrieco, 2014; Piacentini et al., 2017).

In Brazil, ANVISA's RDC n<sup>o</sup> 7 of 2011 provides the maximum tolerated limits (MTL) for mycotoxins in food. The MTL for total aflatoxins is 20  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  for corn and 5.0  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  for cereals and cereal products, including malted barley. Mainly, due to the high consumption of beer in Brazil, it is necessary to characterize the risk of exposure to aflatoxins. Because they are genotoxic and carcinogenic compounds, the risk characterization is done according to the ALARA (As Low As Reasonably Achievable) principle and by calculating the margin of exposure - MOE (EFSA, 2005). Therefore, providing data on the occurrence of aflatoxins in beer and risk assessment can contribute to regulatory bodies setting maximum acceptable levels of aflatoxins in beer, along with other mycotoxins found in the beverage (Kawashima et al., 2006; Simionato et al., 2007; and Piacentini et al., 2015).

Thus, this study aims to evaluate the occurrence of AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2 in Brazilian commercial beers with and without the addition of adjuncts ("pure malt"), and evaluate the carcinogenic risk arising from exposure to aflatoxins due to beer consumption.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Materials

The reagents and materials used were: sodium chloride (NaCl) P.A. grade. (Alphatec, Brazil); sodium phosphate ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) grade P.A. (Sigma Aldrich, USA); sodium phosphate, monobasic, P.A. grade. (Vetec, Brazil); methanol and acetonitrile HPLC grade (Lichrosolv, Germany); 0.45  $\mu\text{m}$  membrane (Millipore, Brazil); immunoaffinity column (AflaTest WB, Vicam Inc, Watertown, USA), ultrapure water from the Mili-Q purification system (Millipore-Merck, USA). A certified standard solution containing the aflatoxins was used at concentrations of 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for AFB1 and AFG1, and 3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for AFB2 and AFG2 (Supelco Analytical, USA).

The equipment used in the experiments were: ultrasonic bath with thermostat (Elma, Elmasonic, USA); VacElut solid-phase extraction system (Varian, USA), model 1260 high-performance liquid chromatography system (Agilent Technologies, USA), and 200 series fluorescence detector (Perkin Elmer, USA). The chromatographic column used was Zorbax Eclipse XDB Rapid Resolution column, 150 x 4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  (Agilent, USA).2.2 Sample

A total of 60 samples of beers industrially produced in Brazil and commercialized in Salvador, Bahia, were purchased in the city's leading supermarket chains from October 2020 to February 2021. According to a beer consumption study conducted by MindMiners and ATKearney (2018), the chosen brands are the most popular in Brazil. Ten beer brands with adjuncts and 10 without adjuncts (also known as pure malt beers), in cans and bottles with varying volumes, were selected. Three samples from different batches were collected from each brand, totaling 30 samples of pure malt beer and 30 with adjunct. All samples were within their expiration dates and were stored under light protection and at room temperature until the day of analysis.

### 2.3 Sample preparation

The samples were transferred to a 250 mL beaker and degassed in an ultrasonic bath for 30 minutes. Then 1.0 g of NaCl was added to a 25 mL aliquot of beer; the mixture was placed in an ultrasonic bath for five minutes to facilitate dissolution and filtered through a Nylon membrane (0.45  $\mu\text{m}$ ). The degassed samples were stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  until the moment of analysis. Sample preparation was performed according to the studies of Nakajima et al., (1999) and Maciel et al., (2017).

### 2.4 Extraction and Purification

The extraction and purification procedure was based on the studies by Nakajima et al. (1999), Maciel et al., (2017), and the Aflatest WB manual (Vicom, USA). Extraction and purification of aflatoxins were performed on an immunoaffinity column with the Vac Elut system. First, the columns were conditioned with 20 mL of phosphate buffer (pH 7.2), and then a 25 mL aliquot of degassed beer at room temperature was passed through at a flow rate of 1 to 2 drops/sec. The column was washed with 10 mL ultrapure water and then eluted with 2 mL methanol, collecting the eluate in 5.0 mL tubes. The solvent was evaporated under a gentle nitrogen jet at  $40^{\circ}\text{C}$ . The derivatization reaction was performed by adding 200  $\mu\text{L}$  of n-hexane and 50  $\mu\text{L}$  of trifluoroacetic acid (TFA) to the dried extract. The reaction took place under light protection for 30 min ( $40^{\circ}\text{C}$ ). Then the solvent was evaporated under a gentle nitrogen flow in a water bath at  $40^{\circ}\text{C}$ , the dry extract resuspension with 500  $\mu\text{L}$  of methanol was performed. An ultrasonic bath for one minute was used to optimize dissolution and then vortexed for 30

seconds. Finally, the extract was filtered directly into auto-sampler vials thru 0.45  $\mu\text{m}$  Nylon membrane.

The chromatographic analysis was performed in isocratic elution mode with mobile phase water: methanol: acetonitrile (50:40:10, v/v/v). The flow rate used was 0.8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  and the injection volume 10  $\mu\text{L}$ . The fluorescence detector was set at excitation and emission wavelengths of 365 and 455 nm, respectively (Maciel et al., 2017).

## 2.5 Quality Assurance

For quality assurance purpose, the analytical method was validated according to the guidelines established by the Brazilian metrology institute, INMETRO, DOC-CGCRE-008 (2016) and ANVISA RDC 166 (2017). Therefore, the parameters for linearity, sensitivity (limit of detection - LOD and limit of quantification LOQ), intra- and inter-run precision, and accuracy (as recovery) were evaluated.

## 2.6 Data Analysis

The AF contents were described as mean, median, minimum, and maximum. The value adopted for the samples with contamination levels below the LOD or the LOQ were entered in the data set as LOD/2, or LOQ/2, respectively, according to the recommendations of the Global Environment Monitoring System - Food Contamination Monitoring and Assessment Program (GEMS/Food) (WHO, 1995) and EFSA (2010). The Kolmogorov-Smirnoff test was used to assess the normality of the distribution of aflatoxin content in beer samples. In addition, the non-parametric Mann-Whitney U test was applied to check if there were differences between the contents of the beer group with and without adjuncts. Statistical treatment was performed with IBM Statistics SPSS v. 23 software (IBM Corporation, USA).

## 2.7 Carcinogenic Risk Assessment

Risk assessment was performed to verify the probability of adverse health effects due to the consumption of beer contaminated by aflatoxins. The daily intake was estimated according to the following equation (Jardim and Caldas, 2009):

$$ID = \frac{C * Q}{PC}$$

Where:

ID: daily intake ( $\mu\text{g/L}$  body weight/day).

C: concentration found in the analyzed samples ( $\mu\text{g/L}$ ).

Q: Average daily intake in liters per capita.

PC: individual body weight (kg of body weight).

The average *per capita* consumption of beer in Brazil was obtained from the Household Budget Survey (2017-2018), made available by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) in 2020. Men's beer consumption *per capita* is 54.5 g/day, and women's is 16.4 g/day, while the average consumption of the general population is 34.7 g/day. These values were converted to the unit of L/day, considering the beer density of  $1.01\text{g.mL}^{-1}$  (BJCP, 2008). After conversion, the estimated beer consumption for women was 0.016 L/day and for men 0.05 L/day. The beer intake of people classified as an elevated consumer, the average consumption value was multiplied by three; this approach can be used when high consumption data are scarce (Arisseto et al. 2008). The average body weight to estimate intake was 60 kg for women and 70 kg for men (IBGE, 2004).

$$MOE = \frac{BMDL_{10}}{ID}$$

Where:

MOE: margin of exposure.

$BMDL_{10}$  = Reference dose lower confidence limit for a reference response of 10% ( $\mu\text{g/kg}$  body weight/day).

ID = daily intake ( $\mu\text{g/kg}$  body weight/day).

The determination of the MOE was carried out in two scenarios: scenario 1 (S1), representing the average beer consumption and scenario 2 (S2), the elevated consumption. The above-mentioned data reveals that men consume three times more beer than women in Brazil. Because of this difference and the average body weight, EWM was estimated for men and women separately. Furthermore, the risk characterization was done for beer consumption with and without adjuncts.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Quality Assurance

The strategy to warrant quality assurance was to fully validate the selected HPLC method after extraction using immunoaffinity SPE columns. The main results of the validated method are described in Table 1. Figure shows chromatograms of a naturally contaminated beer extract (a) and a spiked beer extract (b).

**Table 1.** Quantitative results of the analytical method validation for determining aflatoxin in beer.

<b>Parameters</b>	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b>AFB<sub>2</sub></b>	<b>AFG<sub>1</sub></b>	<b>AFG<sub>2</sub></b>
Linearity (R <sup>2</sup> )	0.990	0.998	0.992	0.996
LOD (ng.L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	2.5	7.5	2.5	7.5
LOQ (ng.L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	10	15	10	15
Precision (RSD) (%)	3.3	4.0	1.7	2.0
Accuracy (%Recovery)	88.5	98.0	98.3	110.1

The linearity was evaluated by estimating the coefficients of determination (R<sup>2</sup>) of the calibration curves for each aflatoxin. The calibration solutions were prepared following the same methodology for preparing the beer samples. The curve consisted of six calibration solutions with the following concentrations: 0.015; 0.031; 0.062; 0.125; 0.25; 0.5 ng.mL<sup>-1</sup> for

AFB1 and AFG1 and 0.045; 0.093; 0.186; 0.375; 0.75; 1.50 ng.mL<sup>-1</sup> for AFB2 and AFG2 and run triplicate. The accepted value for the coefficient of determination ( $R^2$ ) is 0.99 according to ANVISA RDC 166 (2017) and above 0.90 according to DOQ-CGCRE-008 of 2018. The results show that the method has acceptable linearity, with  $R^2$  value  $> 0.99$  for all aflatoxins.

The method's sensitivity (LOD and LOQ) was determined by evaluating the signal-to-noise ratio. However, most samples presented at least one type of aflatoxin at the trace level. To avoid the interference of this occurrence in the determination of the LOD and LOQ, and as the absence of matrix effect was previously verified, the sensitivity test was performed using a 5% hydroalcoholic solution. These limits were determined by injections of a series of solutions with known aflatoxin concentrations until the signal to noise ratio (S/N) was 3 for the LOD and 10 for the LOQ calculations, respectively. These results demonstrate that the technique presents sensitivity within the guidelines.

According to DOC-CGCRE-008 (INMETRO, 2016), the acceptance criterion of repeatability for the working concentration range (in ng.mL<sup>-1</sup>) is up to 30%. The intra-run reproducibility values for all AFT were below or equal to 8.2 %, while for inter-run, they were below 6%, so the validated method shows extremely satisfactory reproducibility results. Accuracy was evaluated by calculating the recovery at three different concentration levels. According to INMETRO (2016), the acceptable value for recovery for the concentration level of 1 ppb, or 1 ng.mL<sup>-1</sup>, should be 40-120%. The obtained data are between 71.1% and 119.1%; the results demonstrate that the validated method presented efficient recovery of aflatoxins in the beer matrix.

### 3.2 Occurrence of aflatoxins in beer samples

The incidence of AFT was higher in the samples of beer with adjuncts; all samples (100%) presented at least one aflatoxin with levels higher than the LOQ. Data are summarized in Table 2. AFB2 had the highest incidence in beer groups, medians of 27 and 40.4 ng.L<sup>-1</sup> for beers with and without adjuncts, respectively. The median and mean values of the levels of AFB1, AFG2 and AFG1 were below the limits of quantification or detection. The AFT content of the positive samples ranged from 11 to 287.6 ng.L<sup>-1</sup>, with a median and mean value of 40.9 ng.L<sup>-1</sup> and 61.6 ng.L<sup>-1</sup>, respectively. The median AFB2 contents were 39.9 ng.L<sup>-1</sup> and the mean value 45.1 ng.L<sup>-1</sup>; the concentration levels ranged from 16.8 to 195.1 ng.L<sup>-1</sup> among the positive samples. In the present investigation, there was

a low incidence of AFB1; only three samples were contaminated with levels higher than the LOQ. The median and mean values of the positive samples were 16 ng.L<sup>-1</sup> and 25 ng.L<sup>-1</sup>, respectively.

**Table 2.** Occurrence of aflatoxins in beers with adjuncts (n=30), and without adjuncts (n=30).

	With adjunct (ng.L <sup>-1</sup> )				Without adjunct (ng.L <sup>-1</sup> )			
	Positives (%)	Mean	Media n	Min-Max	Positives (%)	Mean	Media n	Min-Max
<b>AFB<sub>1</sub></b>	10	<LD	<LD	<LD - <LQ	10	<LQ	<LD	LD -51
<b>AFB<sub>2</sub></b>	97	27.0	32.7	18.8-76.5	80	40.4	32.7	14.8-195.5
<b>AFG<sub>1</sub></b>	10	<LD	<LD	<LD -11.6	27	<LD	<LQ	<LD -75.7
<b>AFG<sub>2</sub></b>	17	<LD	<LQ	<LD -115	23	<LD	<LQ	<LD -139.2
<b>AFT*</b>	100	27.5	40	14.8-166.4	80	41.7	66.3	<LD -287.6

\*AFT=AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>+AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub>

Studies have reported that the use of adjuncts may contribute to the occurrence of aflatoxins in beer (Piacentini et al., 2017); beer samples with (n=30) and without adjuncts (n=30) were analyzed to test this hypothesis. The Mann-Whitney test was used to assess a significant difference between the medians ( $p < 0.05$ ). AFB2 content showed a significant difference between the two groups ( $p = 0.003$ ), the beer samples without adjuncts contained higher levels of AFB2. Similarly, it was observed that in the group of beer without adjuncts, there were higher contents of two or more aflatoxins in the same sample (co-occurrence) but without statistical significance ( $p = 0.22$ ). No significant differences ( $p > 0.05$ ) were found between the contents of total aflatoxins (TFA), AFB1, AFG1, AFG2 in the two groups studied. In contrast, Burdaspal and Legarda et al. (2013) identified higher levels of AFT in beers with an adjunct (corn) compared with those that did not contain this cereal in the composition. The result of this study showed that beer samples with corn (n=105) had a median value of 2.31 ng.L<sup>-1</sup>, while those without corn (n=45) had a median value of 0.73 ng.L<sup>-1</sup>. Burdaspal and Legarda et al. (2013) suggest that the use of corn contributed to the occurrence of aflatoxins in the samples analyzed.

Studies have reported that the use of adjuncts may contribute to the occurrence of aflatoxins in beer (Piacentini et al., 2017); beer samples with (n=30) and without adjuncts (n=30) were analyzed to test this hypothesis. The Mann-Whitney test was used to assess a significant difference between the medians ( $p < 0.05$ ). AFB<sub>2</sub> content showed a significant difference between the two groups ( $p = 0.003$ ), the beer samples without adjuncts contained higher AFB<sub>2</sub> contents. Similarly, it was observed that in the group of beer without adjunct, there were higher contents of two or more aflatoxins in the same sample (co-occurrence) but without statistical significance ( $p = 0.22$ ). No significant differences ( $p > 0.05$ ) were found between the contents of total aflatoxins (TFA), AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> in the two groups studied. In contrast, Burdaspal and Legarda et al. (2013) identified higher levels of AFT in beers with an adjunct (corn) compared with those that did not contain this cereal in the composition. The result of this study showed that beer samples with corn (n=105) had a median value of 2.31 ng.L<sup>-1</sup>, while those without corn (n=45) had a median value of 0.73 ng.L<sup>-1</sup>. Burdaspal and Legarda et al. (2013) suggest that the use of corn contributed to the occurrence of aflatoxins in the samples analyzed.

Benezová et al. (2012) suggest that barley malt and barley are not the main sources of aflatoxin exposure from beer consumption. These authors report that when beer is brewed with quality raw materials stored properly, the risk of aflatoxin occurrence is minimized. Piacentini et al. (2017) point out that in developing countries, such as Brazil, it is common to destine grains of inferior quality for the production of brewing adjuncts; for this reason, these can contain high levels of mycotoxins. The results found in the present study suggest that in addition to the need to evaluate the contamination of brewing adjuncts, it is also necessary to investigate the quality of malt.

Investigations conducted in African countries have revealed significantly higher levels of aflatoxins in craft beer than those reported in this study and other studies conducted in European countries. Matumba et al., (2011) found levels ranging between 8,800 and 34,500 ng.L<sup>-1</sup> in sorghum-based beer marketed in Malwai and Okaru et al., (2017) reported levels between 1,230 and 12,470 ng.L<sup>-1</sup> in beer made with maize produced in Kenya. The authors point out that consumption of the beverage market in these countries poses a high risk of exposure to aflatoxins. According to Okaru et al., (2017), the high levels of contamination found may be due to climatic conditions favorable to the occurrence of aflatoxins and the lack of quality control in the processing and harvesting of grains.

Studies have reported the occurrence of aflatoxin in grains used as beer adjuncts produced in Brazil. Jager et al., (2015) conducted a study to evaluate the exposure of the inhabitants of Pirassununga (São Paulo, Brazil) to AFB1. These authors reported that corn products had the highest incidence of AFB1 and that among the foods analyzed, peanuts and corn were the main sources of aflatoxins in the intake of grains and cereals. In a study conducted in the southern region of Brazil, Oliveira et al. 2017 found levels of AFB1 and AFG1 in corn samples present from all states in the region. Oliveira et al. 2017 point out that they identified samples with aflatoxin levels above the MRL (maximum tolerated limit). Rice is also a cereal containing high levels of aflatoxins, especially in tropical and subtropical regions, such as Brazil.

Although aflatoxins are thermostable, the processing of beer can contribute to the reduction of contamination levels in the final product. The brewing process operations that can lead to a reduction in aflatoxin content are the maceration steps (in malting), fermentation, filtration, and the beer stabilization process (e.g., clarification) (Inoue et al., 2013; Pascari et al., 2018). Inoue et al. 2013 point out that aflatoxins can become adhered to the filtered material and removed after the filtration step. Furthermore, it is worth noting that water accounts for 92-95% of the weight of the beer. Consequently, the concentration of aflatoxins present in the raw material will decrease due to the amount of water added. These factors may have contributed to the occurrence of the low levels of aflatoxins reported in this study. Nevertheless, it is necessary to evaluate the risk of exposure to aflatoxins due to the consumption of beer, considering that it is a beverage consumed on a large scale by Brazilians.

### 3.3 Risk Assessment

The occurrence data reported in the present study showed that the median concentrations of AFB1, AFG1, and AFG2 are lower than the LOD or LOQ. For this reason, the risk assessment was performed only for AFB2 and AFT. The parameters used to calculate intake are described in Table 3 for scenarios 1 (average consumption) and 2 (elevated consumption)

**Table 3.** Parameters applied in the risk assessment for men and women in both scenarios (average and elevated beer consumption).

	Beer with adjuncts				Beer without adjuncts			
	Men		Women		Men		Women	
Parameters	AFB <sub>2</sub>	AFT	AFB <sub>2</sub>	AFT	AFB <sub>2</sub>	AFT	AFB <sub>2</sub>	AFT
<b>C*</b> (µg.L <sup>-1</sup> )	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.05
<b>Q<sub>1</sub>**</b> (L/dia)	0.05	0.05	0.02	0.02	0.05	0.05	0.02	0.02
<b>Q<sub>2</sub>**</b> (L/dia)	0.16	0.16	0.05	0.05	0.16	0.16	0.05	0.05
<b>BW***</b>	70	70	60	60	70	70	60	60
<b>BMDL<sub>10</sub>****</b>	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
<b>ID*****</b>	0.00006	0.00008	0.00002	0.00003	0.00009	0.00011	0.00003	0.00004

C\* AF concentration found in the analyzed samples (µg/L).

Q1\*\*: consumption scenario 1; Q2: consumption scenario 2

BW\*\*\* body weight (Kg)

BMDL<sub>10</sub>\*\*\*\* µg/kg body weight/day

ID\*\*\*\*\* µg/kg of body weight/day

The margins of exposure (MOE) values were used to estimate the carcinogenic risk for exposure to aflatoxins due to beer consumption. According to the European Food Safety Authority (EFSA, 2005), a value for the MOE equal to or greater than 10,000 indicates a situation of little public health concern (EFSA, 2005). In this paper, we evaluate the risk separately for men and women; and in two different scenarios: S1 - by average consumption and S2 - by elevated consumption, comparing beers with and without (pure malt) adjuncts. The MOE data are shown in Table 4 and depicted in Figure 2.

In Scenario 1, the MOEs regarding AFB<sub>2</sub> and AFT for beer consumption with and without adjuncts by men and women presented values greater than 10,000, characterizing a scenario of low risk regarding the carcinogenic effects of aflatoxins. However, the risk estimation for high beer consumption (Scenario 2) shows that men present a higher carcinogenic risk due to exposure to total aflatoxins and AFB<sub>2</sub> than women. This is related to their higher intake; men's beer consumption is three times higher than women's consumption.

**Table 4.** Margins of exposure (MOE) of AFB<sub>2</sub> and AFT due to beer consumption in both scenarios.

	Beer with adjuncts				Beer without adjuncts			
	Men		Women		Men		Women	
	AFB <sub>2</sub>	AFT	AFB <sub>2</sub>	AFT	AFB <sub>2</sub>	AFT	AFB <sub>2</sub>	AFT
<b>MOE S1*</b>	20000	16970	42857	36364	14000	16970	30000	25000
<b>MOE S2**</b>	6250	5303	17143	14545	4375	3643	12000	10000

\* Average beer consumption

\*\* Elevated beer consumption

The estimated elevated beer consumption by men was 0.16 L/day, equivalent to 1.12 L/week. In this scenario, MOE values of less than 10,000 were observed; consequently, people who drink more than one liter of beer per week could be even more exposed to the carcinogenic effects of aflatoxins. The MOE concerning AFT exposure due to elevated beer consumption without adjuncts was 5,303 and 14,545 for men and women, respectively. In this same scenario, the MOE concerning AFT due to consumption of pure malt beers were 3,643 and 10,000 for men and women, respectively. According to the occurrence data reported in the present study, the consumption of beer without adjuncts produced in Brazil presents a higher risk of exposure to AFT and AFB<sub>2</sub> than the consumption of beer with adjuncts.

Lachenmeier et al., (2012) estimated the MOE to AFB<sub>1</sub> considering beer consumption data in Canada. The MOE in the average consumption scenario was 76,540 for the average AFB<sub>1</sub> concentration of beer and 666, considering the maximum levels of contamination. In this scenario, the average consumption considered was 0.34 L per day, which corresponds to beer consumption higher than that of Brazilians, described by the IBGE (2020). Despite this difference, the MOE values described in the present study are comparable to those reported by Lachenmeier et al. (2012). These authors also estimated the MOE for large consumers (1.36 L per day); the MOE obtained was 19,135 for average levels of occurrence of AFB<sub>1</sub> in beer and 166 for the worst case of contamination. This result demonstrates that the consumption of beer containing high levels of aflatoxin represents concern regarding the carcinogenic effects for large consumers in Canada.

Another study reporting a high risk of aflatoxin exposure was conducted by Okaru et al., (2017). They determined the MOE due to the consumption of craft beer made with corn and

sorghum, marketed in Kenya. The MOE found was 16 in the worst-case scenario, considering a daily consumption of 1.1 L/day. This shows an extremely high risk of exposure to aflatoxins. The authors emphasized the risk associated with the consumption of unregistered beers in Kenya due to high levels of AFT contamination. Exposure to mycotoxins is a public health problem, and prevention measures should be adopted (Adeyeye and Idowu-Adebayo, 2021). The application of Good Practices in pre-harvest, harvest, and post-harvest is of fundamental importance to prevent the occurrence of mycotoxins. The grains must go through a drying process after harvest to be stored with a safe level of humidity ( $\leq 10\%$ ). The strict control of temperature and relative humidity during storage is necessary (Adeyeye and Idowu-Adebayo, 2021).

#### **4. Conclusions**

The method validated for determining AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2 levels in beers showed satisfactory sensitivity and reproducibility. The present study described the investigation results of the occurrence of aflatoxins in beers produced in Brazil. This is the first study that reports higher levels of AFB2 in beers without adjuncts when compared with those with other cereals in their composition. According to the occurrence data reported in this study, the high consumption of beer in Brazil may represent a carcinogenic risk of exposure to aflatoxins. Therefore, investigations about the levels of aflatoxins in barley malt and adjuncts used for beer production in Brazil may bring relevant information for the quality control of beer produced in the country and for the safety of consumers of this highly appreciated beverage worldwide.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that there is no conflict of interest.

#### **Acknowledgments**

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) for the scholarship in the Graduate Program in Food Science of the Federal University of Bahia. This investigation was partially supported by grant from FAPESB, number JCB0029/2015.

#### **Author contributions**

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data

curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following.

## References

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2011). Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*.

Arisseto, A. P., & Toledo, M. C. D. F. (2008). Estimativa preliminar da ingestão de acrilamida no Brasil. *Rev Bras Toxicol*, 21(1), 9-14.

Benešová, K., Běláková, S., Mikulíková, R., & Svoboda, Z. (2012). Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry. *Food Control*, 25(2), 626-630. <https://doi:10.1016/j.foodcont.2011.11.033>.

Bertuzzi, T., Rastelli, S., Mulazzi, A., Donadini, G., & Pietri, A. (2011). Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. *Food control*, 22(12), 2059-2064. <https://doi:10.1016/j.foodcont.2011.06.002>.

BJCP, Beer Judge Certification Program. (2008). Retrieved from <http://www.bjcp.org/intl/2008styles-PT.pdf>. Accessed September 26, 2021.

Brasil. (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a *fiscalização* da produção e do comércio de bebidas. Diário Oficial [da] União, Brasília.

BRASIL. (2017). Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.

Brasil. (2019). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 9902, de 08 de julho de 2019. Diário Oficial da União, Brasília. 2019. Diário Oficial [da] União, Brasília.

Retrieved from [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2019-2022/2019/decreto/D9902.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/decreto/D9902.htm). Accessed September 26, 2021.

Burdaspal, P. A., & Legarda, T. M. (2013). Survey on aflatoxin in beer sold in Spain and other European countries. *World Mycotoxin Journal*, 6(1), 93-101. <https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1465>.

D'Avila, R. F., Luvielmo, M. D. M., Mendonça, C. R. B., & Jantzen, M. M. (2012). Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, 8(2), 60-68. <https://doi.org/10.4013/4160>.

European Food Safety Authority. (2010). Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. *EFSA Journal*, 8(3), 1557.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, & International Agency for Research on Cancer. (2002). *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene* (No. 82). World Health Organization.

IBGE – Instituto Brasileiro de geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017/2018. (2020) Retrieved from <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101670.pdf>. Accessed September 26, 2021.

INMETRO. (2016). Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos-DOC-CGCRE-008, revisão 05-ago-2016.

Inoue, T., Nagatomi, Y., Uyama, A., & Mochizuki, N. (2013). Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 130027. <https://doi.org/10.1271/bbb.130027>.

Jager, A. V., Tonin, F. G., Baptista, G. Z., Souto, P. C., & Oliveira, C. A. (2016). Assessment of aflatoxin exposure using serum and urinary biomarkers in São Paulo, Brazil: A pilot study. *International journal of hygiene and environmental health*, 219(3), 294-300.

Jardim, A. N. O., & Caldas, E. D. (2009). Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Química Nova*, 32, 1898-1909.

Kawashima, L. M., & Valente Soares, L. M. (2006). Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. *Food Science and Technology*, 26(3), 516-521.

- Khan, M. Z., Hameed, M. R., Hussain, T., Khan, A., Javed, I., Ahmad, I., & Islam, N. U. (2013). Aflatoxin residues in tissues of healthy and sick broiler birds at market age in Pakistan: A one year study. *Pak Vet J*, 33(4), 423-427. <https://doi/10.1002/jssc.201200752>.
- Khayoon, W. S., Saad, B., Yan, C. B., Hashim, N. H., Ali, A. S. M., Salleh, M. I., & Salleh, B. (2010). Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. *Food chemistry*, 118(3), 882-886. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.082>.
- Lachenmeier, D. W., Przybylski, M. C., & Rehm, J. (2012). Comparative risk assessment of carcinogens in alcoholic beverages using the margin of exposure approach. *International Journal of Cancer*, 131(6), E995-E1003.
- Leslie, J. F., & Morris, J. B. (2019). Perspective: Talking About Mycotoxins. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 109. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00109>.
- Mably, M., Mankotia, M., Cavlovic, P., Tam, J., Wong, L., Pantazopoulos, P., ... & Scott, P. M. (2005). Survey of aflatoxins in beer sold in Canada. *Food additives and contaminants*, 22(12), 1252-1257. <https://doi.org/10.1080/02652030500241884>.
- Maciel, L. F., Felício, A. L. D. S. M., Miranda, L. C. R., Pires, T. C., Bispo, E. D. S., & Hirooka, E. Y. (2018). Aflatoxins and ochratoxin A in different cocoa clones (*Theobroma cacao* L.) developed in the southern region of Bahia, Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(1), 134-143. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1397293>.
- Matumba, L., Monjerezi, M., Khonga, E. B., & Lakudzala, D. D. (2011). Aflatoxins in sorghum, sorghum malt and traditional opaque beer in southern Malawi. *Food Control*, 22(2), 266-268. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.008>.
- Matumba, L., Van Poucke, C., Biswick, T., Monjerezi, M., Mwatseteza, J., & De Saeger, S. (2014). A limited survey of mycotoxins in traditional maize based opaque beers in Malawi. *Food Control*, 36(1), 253-256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.032>
- MindMiner; A.T. Kearney. 2019. Estudo original consumo de cerveja, São Paulo, 2018. Retrived from <http://revistabeerart.com/news/estudo-consumo-cerveja-brasil/>. Accessed April 5, 2021.

- Nakajima, M., Tsubouchi, H., & Miyabe, M. (1999). A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 82(4), 897-902.
- Nigussie, A., Bekele, T., Fekadu Gemedo, H., & Zewdu Woldegiorgis, A. (2018). Level of aflatoxins in industrially brewed local and imported beers collected from Ethiopia market. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1), 1453317. <https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1453317>.
- Okaru, A. O., Abuga, K. O., Kibwage, I. O., Hausler, T., Luy, B., Kuballa, T., ... & Lachenmeier, D. W. (2017). Aflatoxin contamination in unrecorded beers from Kenya – A health risk beyond ethanol. *Food Control*, 79, 344-348. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.006>.
- Okoye, Z. S. (1986). Carryover of aflatoxin B<sub>1</sub> in contaminated substrate corn into Nigerian native beer. *Bull. Environ. Contam. Toxicol. (United States)*, 37(4). <https://doi.org/10.1007/BF01607792>.
- 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*, 73, 127-132.
- Pascari, X., Ortiz-Solá, J., Marín, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2018). Survey of mycotoxins in beer and exposure assessment through the consumption of commercially available beer in Lleida, Spain. *Lwt*, 92, 87-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.038>
- Pesquisa de Orçamentos Familiares, P. (2004). Familiares 2002-2003. *Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística–IBGE.
- Piacentini, K. C., Rocha, L. O., Fontes, L. C., Carnielli, L., Reis, T. A., & Corrêa, B. (2017). Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B<sub>1</sub> and deoxynivalenol in beer quality. *Food chemistry*, 218, 64-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.062>.
- Piacentini, K. C., Rocha, L. O., Savi, G. D., Carnielli-Queiroz, L., & Corrêa, B. (2018). Beer industry in Brazil: Economic aspects, characteristics of the raw material and concerns. *Kvasny Prumysl*, 64(6), 284-286. <https://doi.org/10.18832/kp201833>.

- Piacentini, K. C., Savi, G. D., Olivo, G., & Scussel, V. M. (2015). Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. *Food Control*, *50*, 925-929. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.038>.
- Pietri A, Bertuzzi T, Agosti B, Donadini G. (2010). Transfer of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process. *Food Addit Contam Part A*. *27*(10):1431-9. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.489912>.
- Pleadin, J., Frece, J., & Markov, K. (2019). Mycotoxins in food and feed. *Advances in food and nutrition research*, *89*, 297-345. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.007>.
- Raters, M., & Matissek, R. (2008). Thermal stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Mycotoxin research*, *24*(3), 130-134.
- Ruiz-Medina, A., & Fernández-de Córdova, M. L. (2015). Aflatoxin B1 in beer at different stages of production. In *Processing and impact on active components in food* (pp. 517-523). Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00062-7>.
- Simionato, E. M., & de Menezes, M. L. (2007). Determinação de ocratoxinas em cervejas, por injeção direta da amostra empregando uma coluna cromatografica IS-aniônica. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, *66*(3), 234-239.
- SINDICERV- Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. 2016. A Cerveja – tipos de cerveja. Retrived from <https://www.sindicerv.com.br/>. Accessed April 5, 2020.
- Sleiman, M., Venturini Filho, W. G., Ducatti, C., & Nojimoto, T. (2010). Determinação do percentual de malte e adjuntos em cervejas comerciais brasileiras através de análise isotópica. *Ciência e agrotecnologia*, *34*(1), 163-172.
- Sweeney, M. J., & Dobson, A. D. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International journal of food microbiology*, *43*(3), 141-158.
- USDA- United States Department of Agriculture. 2020. Beer Marketing Report. Retrived from <https://usdabrazil.org.br/wp-content/uploads/2020/06/beer-market-report-2019.pdf>. Accessed April 6, 2020.
- Venturini, W. G. (2000). Tecnologia de cerveja. Funep.

VICAM. 2008. AflatestWB Instruction Manual. Retried from <http://www.weber.hu/Downloads/VicamManuals/G1068.pdf/>. Accessed April 8, 2020.

World Health Organization. (2019). *Global status report on alcohol and health 2018*. World Health Organization.

Figures

Figure 1. Chromatograms of aflatoxins in beer: a naturally contaminated sample (a), and a sample spiked with 65 ng.L-1 of the AF mix (b)

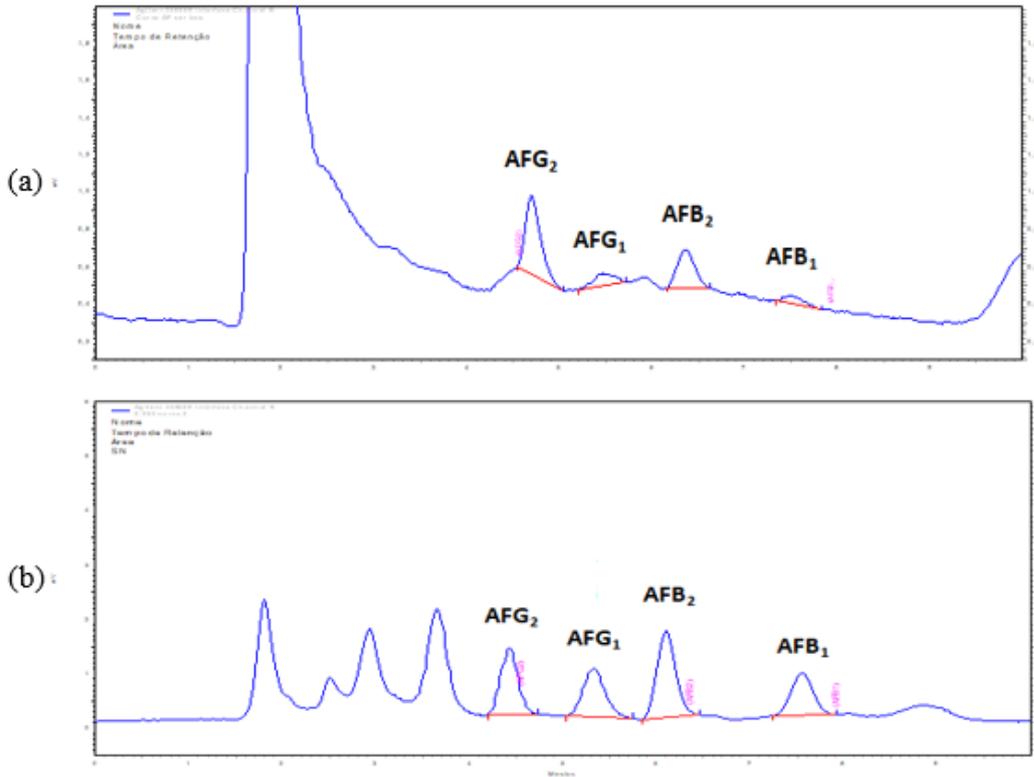


Figure 2. Margins of exposure for total aflatoxins due to average and elevated consumption of beers with and without adjuncts for men and women separately.

