

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

**TRICOTECENOS EM MILHO: OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA A GÁS ASSOCIADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS E LEVANTAMENTO DA INCIDÊNCIA EM
MILHO E EM PRODUTOS DE MILHO NO ESTADO DE SÃO PAULO**

THAÏS VALÉRIA MILANEZ

Química
Mestre em Engenharia de Alimentos

Profa. Dra. LÚCIA MARIA VALENTE SOARES

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas - SP

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Milanez, Thaïs Valéria
M589t Tricotecenos em milho: otimização e avaliação de
método analítico utilizando cromatografia a gás associada
à espectrometria de massas e levantamento da incidência
em milho e em produtos de milho no estado de São Paulo
/ Thaïs Valéria Milanez. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

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

1.Cromatografia a gás. 2.Espectrometria de massas.
3.Milho. 4.Produtos de milho. 5.Tricotecenos. I.Soares,
Lúcia Maria Valente. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benedito Corrêa
(membro)

Dr. Eduardo Vicente
(membro)

Dra. Maria Antonia Calori Domingues
(membro)

Profa. Dra. Maria Regina Bueno Franco
(membro)

Dra. Myrna Sabino
(membro)

Profa. Dra. Neura Bragagnolo
(membro)

Profa. Dra. Lúcia Maria Valente Soares
(orientadora)

Campinas, de

de 2003

***“Porque, segundo o sábio Salomão,
sabedoria, não entra em alma malvada
e ciência sem consciência não
passa de ruína da alma.”***

Rabelais (1464?-1553), Pantagruel, II 8

Dedico este trabalho

À DEUS, por tudo,

Ao MARTIN, pelo apoio e carinho

Aos meus PAIS e minha irmã PATRÍCIA, pelo incentivo, apoio e amor

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lúcia Maria Valente Soares, pela brilhante orientação, dedicação, apoio e em particular pela amizade.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões apresentadas para a redação final da tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Adolfo Lutz, nas pessoas de Dra. Myrna Sabino e Dr Odair Zenebon, pela oportunidade e pelo apoio institucional.

Ao Dr Paulo Tiglea, diretor do Serviço de Química Aplicada do IAL, pelo total apoio.

À Gisleine Gomes Baptista, pela amizade e auxílio laboratorial.

Ao Sr George Jacuviske da FINNIGAN MAT Brasil, pela colaboração nos inúmeros ajustes instrumentais.

À Cooperativa Agrícolas CAROL, nas pessoas dos Sr Antonio Luis Sanitá e Sr. Ithiel Parada Júnior e à Cooperativa Agrícola COOP, nas pessoas dos Sr. Franco Brentegani e Sr Franz Hippler Neto pela cessão das amostras de milho.

Ao Dr Jorge Moreira Vaz do IPT/USP, pelas preciosas sugestões e informações prestadas.

Ao Dr Marcos N. Eberlin do Instituto de Química da UNICAMP, pelas brilhantes sugestões.

À Janete Alaburda, Leda C.A. Lamardo, Miriam Solange Caruso, Sabria Aued Pimentel e Valter Ruvieri pelas sugestões e amizade.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

Muito Obrigada

ÍNDICE GERAL

	página
ÍNDICE DE TABELAS	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS	xxiii
RESUMO GERAL	xxv
GENERAL SUMMARY	xxix
INTRODUÇÃO	1
Capítulo 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
RESUMO	7
REVISÃO DA LITERATURA	8
1. O milho no Brasil	8
2. Tricotecenos	9
2.1. Estrutura química e estabilidade	9
2.2. Microrganismos produtores	13
2.3. Efeitos tóxicos dos tricotecenos	14
2.4. Fatores que afetam a produção de tricotecenos	20
3. Descontaminação de alimentos e rações	21
4. Regulamentação da presença de tricotecenos em alimentos	24
5. Ocorrência de tricotecenos	25
5.1. Ocorrência em nível mundial	25
5.2. Ocorrência no Brasil e na América do Sul	29

6.	Aspectos analíticos na determinação de tricotecenos	31
6.1.	Cromatografia em camada delgada	31
6.2.	Cromatografia líquida de alta eficiência	32
6.3.	Cromatografia gasosa	34
6.4.	Espectrometria de massas	38
6.5.	Imunoensaios	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	Capítulo 2: OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE TRICOTECENOS EM MILHO POR CROMATOGRAFIA À GÁS ASSOCIADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	65
	RESUMO	67
	INTRODUÇÃO	68
	MATERIAL E MÉTODOS	70
1.	Amostras	70
2.	Padrões	70
2.1.	Tricotecenos: desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas T-2 (T2) e HT-2 (HT2)	70
2.2.	Padrão interno	70
3.	Solventes e reagentes	71
4.	Colunas	71
5.	Equipamentos	71
6.	Avaliação de sistemas de derivação	72

6.1.	Sem derivação	73
6.2.	Derivação com trimetilsilimidazol	73
6.3.	Derivação com anidrido pentafluoropropiônico	73
6.4.	Derivação com anidrido trifluoroacético	74
7.	Avaliação de padrão interno	75
8.	Avaliação de sistema de extração e limpeza	75
8.1.	Teste do sistema de extração e limpeza de OLIVEIRA e SOARES (2001)	76
8.2.	Teste do sistema de extração e limpeza preconizado por Romer Labs Inc. usando coluna MycoSep 225	76
8.2.1.	Teste de extração usando concentração do extrato da amostra antes da limpeza em coluna MycoSepEP 225	77
8.2.2.	Teste de extração usando coluna MycoSep 227	77
9.	Recuperação, repetibilidade e limites de detecção e quantificação	77
10.	Confirmação dos resultados	78
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
1.	Escolha do melhor sistema de derivação	79
1.1.	Sem derivação	79
1.2.	Derivação com trimetilsililimidazol	79
1.3.	Derivação com anidrido pentafluoropropiônico	89
1.4.	Derivação com anidrido trifluoroacético	90
2.	Escolha do melhor padrão interno	98
3.	Confirmação dos resultados	101
4.	Avaliação de sistema de extração e limpeza	106
4.1.	Teste do sistema de extração e limpeza de OLIVEIRA & SOARES (2001) utilizando coluna MycoSep 225	106

4.2.	Teste do sistema de extração e limpeza preconizado por Romer Labs com concentração antes de limpeza em coluna MycoSep 225	107
4.3.	Teste do sistema de extração e limpeza preconizado por Romer Labs usando as colunas MycoSep 225/227	110
4.4.	Teste de sistema de extração e limpeza preconizado por Romer Labs associado à limpeza em coluna MycoSep 227	116
5.	Recuperação, repetibilidade, limites de detecção e quantificação	125
	CONCLUSÕES	136
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
	 Capítulo 3: INCIDÊNCIA DE TRICOTECENOS (DON, NIV. DAS, T2 E HT2) EM PRODUTOS DE MILHO COMERCIALIZADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO	143
	RESUMO	145
	INTRODUÇÃO	146
	MATERIAL E MÉTODOS	148
1.	Amostras	148
2.	Padrões	148
2.1.	Tricotecenos: desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas T-2 (T2) e HT-2 (HT2) e	148
2.2.	Padrão interno	148
3.	Solventes e reagentes	149
4.	Colunas	149
5.	Equipamentos	149
6.	Determinação de tricotecenos	150
7.	Controle de qualidade analítica	151

8.	Confirmação de identidade	152
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	153
1.	Controle de qualidade analítica	153
2.	Ocorrência de tricotecenos	156
3.	Confirmação da identidade	159
	CONCLUSÕES	160
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
	Capítulo 4: INCIDÊNCIA DE TRICOTECENOS (DON, NIV, DAS, T2 E HT2) EM MILHO PRODUZIDO NO ESTADO DE SÃO PAULO	165
	RESUMO	167
	INTRODUÇÃO	168
	MATERIAL E MÉTODOS	169
1.	Amostras	169
2.	Padrões	170
2.1	Tricotecenos: desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas T-2 (T2) e HT-2 (HT2)	170
2.2	Padrão interno	170
3.	Solventes e reagentes	170
4.	Colunas	170
5.	Equipamentos	171
6.	Determinação de tricotecenos	172
7.	Controle de qualidade analítica	173
8.	Confirmação de identidade	173

RESULTADOS E DISCUSSÃO	175
1. Controle de qualidade analítica	175
2. Ocorrência de tricotecenos	176
3. Confirmação da identidade	177
CONCLUSÕES	180
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181
CONCLUSÕES GERAIS	185

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	DL 50 intraperitoneal de alguns tricotecenos para ratos	18
Tabela 2	Níveis máximos tolerados de tricotecenos em alimentos e rações	25
Tabela 3	Incidência de tricotecenos em alimentos e rações à base de milho em nível mundial	28
Tabela 4	Ocorrência de tricotecenos em cereais da América do Sul	30

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Tempos de retenção de tricotecenos cromatografados com e sem derivação	86
Tabela 2	Massas características dos tricotecenos de acordo com a derivação realizada	92
Tabela 3	Sensibilidade (relação área integrada/massa) para cada um dos tricotecenos derivados por sililação e trifluoroacetilação	97
Tabela 4	Fragmentos mais característicos do alfa-cloralose derivado	99

Tabela 5	Fragmentos m/z derivados mais usuais selecionados para quantificação	103
Tabela 6	Tricotecenos trifluoroacetilados fragmentados no modo impacto de elétrons (70 eV) usados para a etapa de confirmação	105
Tabela 7	Recuperação (%) de tricotecenos em amostras de fubá e farinha de milho artificialmente contaminadas, utilizando-se duas alíquotas diferentes de eluatos para concentração anterior à derivação	111
Tabela 8	Comparação dos valores de recuperação (%) de amostras de milho e produtos enriquecidos com DON, NIV, DAS, HT2 e T2 usando limpeza em colunas MycoSep 225 e 227	115
Tabela 9	Valores de recuperação para DON, NIV, DAS, HT2 e T2 para amostras de milho em grão	125
Tabela 10	Valores médios de recuperação para DON, NIV, DAS, HT2 e T2 para amostras de produtos de milho	126
Tabela 11	Limites de detecção (ng/g) de derivados trifluoroacetilados de DON, NIV, DAS, HT2 e T2 determinados em milho em grão e produtos de milho por CG-EM	133
Tabela 12	Limites de quantificação (ng/g) de derivados trifluoroacetilados de DON, NIV, DAS, HT2 e T2 determinados em milho em grão e produtos de milho por CG-EM	134

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Fragmentos m/z de tricotecenos e padrão interno trifluoroacetilados selecionados para quantificação	152
Tabela 2	Dados dos tricotecenos trifluoroacetilados fragmentados sob modo impacto de elétrons (70 eV)	153
Tabela 3	Limites de detecção (ng/g) e quantificação (ng/g) de derivados trifluoroacetilados de DON, NIV, DAS, T2 e HT2, determinados em produtos de milho POR CG/EM	154
Tabela 4	Valores médios de recuperação para DON, NIV, DAS, HT2 e T2 para amostras de produtos de milho	155

CAPÍTULO 4

Tabela 1	Fragmentos (m/z) de tricotecenos e PI trifluoroacetilados selecionados para quantificação, modo impacto de elétrons (70 eV)	174
----------	---	-----

Tabela 2	Dados dos tricotecenos DON, NIV, DAS, HT2 e T2 trifluoroacetilados fragmentados no modo impacto de elétrons (70 eV)	174
Tabela 3	Valores de limites de detecção e quantificação, em ng/g, para desoxinivalenol, nivalenol, diacetoxiscirpenol, toxinas HT-2 e T-2 em milho	175

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Estrutura proposta do tricotecano	9
Figura 2	Estrutura e numeração dos tricotecenos	10
Figura 3	Estrutura dos tricotecenos do grupo A	11
Figura 4	Estrutura dos tricotecenos do grupo B	11
Figura 5	Estrutura dos tricotecenos do grupo C	12

CAPÍTULO 2

Figura 1	Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 48,6 ng de desoxinivalenol (DON) sem derivação e seu respectivo espectro de massas obtido em modo <i>full scan</i> (m/z 50-300) (70 eV), utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (Restek Corp., PA).	80
Figura 2	Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 130 ng de diacetoxiscirpenol (DAS) sem derivação e seu respectivo espectro de massas obtido em modo <i>full scan</i> (m/z 50-300) (70 eV), utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (Restek Corp., PA).Cromatograma e espectro de massas de DAS não derivado, modo <i>full scan</i> (m/z 0-300)	81
Figura 3	Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 41,7 ng de nivalenol	82

(NIV) sem derivação e seu respectivo espectro de massas obtido em modo *full scan* (m/z 50-320) (70 eV , utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (Restek Corp., PA).Cromatograma e espectro de massas de NIV não derivado, modo *full scan* (m/z 50-320)

Figura 4	Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 73 ng de toxina HT-2 (HT2) sem derivação e seu respectivo espectro de massas obtido em modo <i>full scan</i> (m/z 50-300) (70 eV), utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (Restek Corp., PA).Cromatograma e espectro de massas de HT2 não derivado, modo <i>full scan</i> (m/z 50-300)	83
Figura 5	Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 43 ng de toxina T-2 (T2) sem derivação e seu respectivo espectro de massas obtido em modo <i>full scan</i> (m/z 50-300) (70 eV), utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (Restek Corp., PA).	84
Figura 6	Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 2,4 ng de desoxinivalenol (DON), 2,1 ng de nivalenol (NIV), 2,2 ng de diacetoxiscirpenol (DAS), 22 ng de toxina HT-2 (HT2) e 10 ng de toxina T-2 (T2), todos sililados, utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (Restek Corp., PA). Programação: 80°C/0,20 min, para 205°C a 18°C/min, 205°C/0,25min, até 270°C a 2°C/min	85
Figura 7	Espectro de massas de desoxinivalenol sililado (70 eV)	86
Figura 8	Espectros de massas de nivalenol sililado (70 eV)	87
Figura 9	Espectros de massas de diacetoxiscirpenol sililado (70 eV)	87
Figura 10	Espectros de massas de toxina HT-2 sililado (70 eV)	88
Figura 11	Espectros de massas de toxina T-2 sililado (70 eV)	88
Figura 12	Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas dos tricotecenos pentafluoroacetilados, utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (Restek Corp., PA)	89
Figura 13	Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 4 ng de cada um dos	91

tricotecenos trifluoroacetilados, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2), T-2 (T2) e alfa-cloralose (PI), utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (Restek Corp., PA)

Figura 14	Espectro de massas de desoxinivalenol trifluoroacetilado (impacto de elétrons 70 e V)	94
Figura 15	Espectro de massas de nivalenol trifluoroacetilado (impacto de elétrons 70 e V)	95
Figura 16	Espectro de massas de diacetoxiscirpenol trifluoroacetilado (impacto de elétrons 70 e V)	95
Figura 17	Espectro de massas de toxina HT-2 trifluoroacetilado (impacto de elétrons 70 e V)	96
Figura 18	Espectro de massas de toxina T-2 trifluoroacetilado (impacto de elétrons 70 e V)	96
Figura 19	Espectro de massas de alfa-cloralose sililada (impacto de elétrons 70 e V)	100
Figura 20	Espectro de massas de alfa-cloralose trifluoroacetilada (impacto de elétrons 70 e V)	101
Figura 21	Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de canjica não contaminada, extraída e limpa por método usando coluna MycoSep 225, submetida à derivação com TFAA, sendo o cromatograma superior obtido com os íons totais (TIC) e o inferior com reconstrução dos íons (RIC múltiplo)	104
Figura 22	Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de canjica contaminada artificialmente com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2), extraída e limpa por método usando 50 mL do extrato concentrado antes de passagem pela coluna MycoSep 225 e submetida à derivação com TFAA	108
Figura 23	Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de canjica com alfa-cloralose (PI) e contaminada artificialmente com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2), extraída e limpa por método usando 20 mL do extrato concentrado antes de passagem pela coluna MycoSep 225 e submetida à derivação com TFAA	109

- Figura 24 Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de farinha de milho sem contaminação, apenas com alfa-cloralose (PI), extraída e limpa por método usando 4 mL do extrato concentrado antes de passagem pela coluna MycoSep 225 e submetida à derivação com TFAA Cromatograma de amostra de farinha de milho sem contaminação 113
- Figura 25 Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de farinha de milho com alfa-cloralose (PI) e contaminada artificialmente com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2). Amostra extraída e limpa por método usando 4 mL do extrato concentrado antes de passagem pela coluna MycoSep 225 e submetida à derivação com TFAA 114
- Figura 26 Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de canjica artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2). Amostra foi limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos para DON, NIV, DAS, HT2 e T2, respectivamente. 117
- Figura 27 Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de farinha de milho artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2). Amostra foi limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos para DON, NIV, DAS, HT2 e T2, respectivamente. 118
- Figura 28 Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de flocos de milho artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2). Amostra foi limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos para DON, NIV, DAS, HT2 e T2, respectivamente. 119
- Figura 29 Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de milho sem 120

gasosa/espectrometria de massas de amostra de milho em grão artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2). Amostra foi limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos para DON, NIV, DAS , HT2 e T2, respectivamente.

- Figura 30 Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de milho verde em lata artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2). Amostra foi limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos para DON, NIV, DAS , HT2 e T2, respectivamente. 121
- Figura 31 Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de quirera artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2). Amostra foi limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos para DON, NIV, DAS , HT2 e T2, respectivamente. 122
- Figura 32 Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de sêmola artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2). Amostra foi limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos para DON, NIV, DAS , HT2 e T2, respectivamente. 123
- Figura 33 Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de fubá artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2). Amostra foi limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos para DON, NIV, DAS , HT2 e T2, respectivamente. 124

respectivamente.

Figura 34	Curva de calibração interna de Desoxinivalenol (DON)	128
Figura 35	Curva de calibração interna de Nivalenol (NIV)	128
Figura 36	Curva de calibração interna de Diacetoxiscirpenol (DAS)	129
Figura 37	Curva de calibração interna de toxina HT-2 (HT2)	129
Figura 38	Curva de calibração interna de toxina T-2 (T2)	130
Figura 39	Curva de calibração externa de Desoxinivalenol (DON)	130
Figura 40	Curva de calibração externa de Nivalenol (NIV)	131
Figura 41	Curva de calibração externa de Diacetoxiscirpenol (DAS)	131
Figura 42	Curva de calibração externa de toxina HT-2 (HT2)	132
Figura 43	Curva de calibração externa de toxina T-2 (T2)	132

CAPÍTULO 3

Figura 1	Cromatograma obtido a partir de cromatografia a gás/espectrometria de massas (CG/EM) de amostra de quirera naturalmente contaminada trifluoroacetilada com com toxinas HT-2 e T-2, 555 ng/g e 767 ng/g, respectivamente (A); espectro de massas de HT2 referente à amostra contaminada trifluoroacetilada (B); espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) de T2 referente á amostra contaminada (C). Derivados trifluoroacetilados, coluna utilizada Rtx-5MS (Restek Corp.)	157
Figura 2	Cromatograma obtido a partir de CG/EM de amostra de farinha de milho pré-cozida trifluoroacetilada com traços de desoxinivalenol (DON) (A); espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) de DON referente a esta amostra (B). Derivados trifluoroacetilados, coluna utilizada Rtx-5MS (Restek Corp.)	158
Figura 3	Cromatograma obtido a partir de CG/EM de amostra de farinha de milho pré-cozida trifluoroacetilada com traços de nivalenol (NIV) (A); espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) de NIV referente a (A) nada (B). Coluna Rtx-5MS (Restek Corp.)	158

CAPÍTULO 4

- Figura 1 Cromatograma com os íons totais (TIC) obtido por 178
cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra
contaminada naturalmente com NIV (A); cromatograma
reconstituído de (A) com os fragmentos característicos de
NIV (B); espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV)
de NIV referente ao mesmo cromatograma (C)
- Figura 2 Cromatograma dos íons reconstituídos (RIC) obtido por 179
CG/EM para DON de amostra de milho naturalmente
contaminada e trifluoroacetilada (A); cromatograma RIC para
NIV da mesma amostra (B); espectro de massas de DON
referente à amostra contaminada (C); espectro de massas de
impacto de elétrons (70 eV) de NIV referente á amostra
contaminada (D)

RESUMO GERAL

Um bom número de espécies de fungos pode, sob condições especiais, produzir metabólitos secundários tóxicos conhecidos como micotoxinas. Cerca de 20 grupos de toxinas são conhecidos hoje, porém, algumas têm recebido atenção especial devido à sua toxicidade e ampla ocorrência natural: aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina A, fumonisinas e tricotecenos.

Os tricotecenos constituem um grupo de cerca de mais de uma centena de compostos caracterizados pela presença do sistema 12,13-epoxi-tricotec-9-eno em suas estruturas. A maior parte dos tricotecenos conhecidos foi isolada apenas em laboratório, porém, alguns deles foram obtidos e caracterizados como contaminantes naturais. Dentre estes podem ser citados o desoxinivalenol (DON), o nivalenol (NIV), a toxina T-2 (T2), o diacetoxiscirpenol (DAS) e menos frequentemente os derivados 3-acetil-desoxinivalenol (3-Ac-DON) e 15-acetil-desoxinivalenol (15-Ac-DON), a fusarenona-X (FX) e a toxina HT-2 (HT2). Entre todos, o DON é o de maior ocorrência em alimentos e rações animais, porém é também o menos tóxico.

Apesar do milho (*Zea Mays*) ser um dos substratos mais susceptíveis a este tipo de contaminação, há poucos dados sobre o milho brasileiro. Brasil é o terceiro colocado quanto à produção mundial de milho, colhendo ao redor de 30 milhões de toneladas por ano e, portanto, um cereal com grande impacto na economia brasileira. Estes fatos apontam a necessidade de avaliar a extensão e o tipo de contaminação de tricotecenos em milho nacional.

Por outro lado, a similaridade das estruturas químicas dos tricotecenos exige o uso de cromatografia com alto poder de resolução para sua separação como é o caso da cromatografia à gás. As diferentes toxicidades para os diversos membros do grupo requer, por sua vez, que a identidade de cada toxina seja

confirmada por um sistema de alta confiabilidade como a espectrometria de massas

O presente trabalho visou avaliar a incidência de tricotecenos em milho plantado no estado de São Paulo e em produtos de milho comercializados na cidade de São Paulo. Dentre os tricotecenos, DON e NIV foram escolhidos devido a maior frequência com que são encontrados em todo o mundo. As toxinas DAS, HT2 e T2 foram incluídas devido às suas maiores toxicidades e ocorrência natural comprovada em alimentos e rações.

Para alcançar os objetivos descritos foi inicialmente avaliado método para determinação simultânea destes 5 tricotecenos por cromatografia à gás associada à espectrometria de massas. O método analítico após otimização e avaliação apresentou limites de detecção variando de 20 a 60 ng/g para DON, de 10 a 40 ng/g para NIV, de 20 a 120 ng/g para DAS, de 20 a 50 ng/g para HT2 e de 20 a 100 ng/g para T2, de acordo com a as matrizes testadas (milho em grão, milho verde em lata, farinha de milho, canjica, fubá e flocos de milho). Da mesma forma, as recuperações variaram de 83 a 113% para DON, de 84 a 115% para NIV, de 69 a 123% para DAS, de 82 a 155% para HT2 e de 71 a 96% para T2.

Foram analisadas 80 amostras de milho produzido em duas cooperativas do estado de São Paulo, tendo sido encontradas 11 amostras contendo NIV e uma com DON em nível de traços. Além disso, cinco amostras apresentaram NIV em níveis variando de 51 a 106 ng/g e uma delas co-contaminada com 71 ng/g de DON.

Foram também analisadas 78 amostras de produtos de milho comercializados na cidade de São Paulo, sendo que uma delas, farinha de milho, apresentou traços de DON e NIV e outra, quirera, apresentou 555 ng/g e 767 ng/g de toxinas T2 e HT2, respectivamente.

Os resultados obtidos nos levantamentos realizados nos anos de 2000 a 2002, mostram baixa ocorrência de tricotecenos, não havendo risco para a

população no consumo destes produtos. Devido à sazonalidade da contaminação por micotoxinas em alimentos, conclusões mais amplas só serão possíveis após vários anos de observação da presença dessas toxinas em milho plantado no estado de São Paulo e produtos de milho comercializados na cidade de São Paulo.

Palavras – chave: tricotecenos, milho, produtos de milho, cromatografia à gás, espectrometria de massas.

GENERAL ABSTRACT

A great number of the fungal species, under specific conditions, can produce toxic secondary metabolites known as mycotoxins. About 20 groups of such toxins are known today but some have received special attention due to their toxicity and widespread natural occurrence: aflatoxins, zearalenone, ochratoxin A, fumonisins and trichothecenes.

The trichothecenes constitute a group of more than a hundred compounds characterized by the presence of the system 12,13-epoxy-trichotec-9-en in their structures. However, most of the known trichothecenes have been isolated only in laboratory conditions. Just a few have been isolated and characterized as natural contaminants. Among them, deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxin T-2 (T2), diacetoxyscirpenol (DAS) and less frequently the derivatives 3-acetyl-deoxynivalenol (3-Ac-DON), 15-acetyl-deoxynivalenol (15-Ac-DON), fusarenone X (FX) and the toxin HT-2 (HT2). DON is the trichothecene most frequently found in foods and feeds and it's also the less toxic of this family.

Despite the fact that corn is one of the substrates more susceptible to this type of contamination, there is little information on the occurrence of trichothecenes in Brazilian corn. Brazil ranks third in world production of corn, harvesting about 30 million tons annually, and corn is a grain with great impact in Brazilian economy. These facts point to the need to evaluate the extension and the type of trichothecene contamination in national corn.

On the other hand, the similarity of the trichothecene chemical structures requires the use of a high resolution gas chromatographic method for their separation. The differing toxicities for the members of this group of toxins requires, by their turn, that the identity of each toxin be confirmed by a system capable of great degree of reliability such as mass spectrometry.

The present work aimed at evaluating the occurrence of trichothecenes in corn planted in the State of São Paulo and in corn products commercialized in the city of São Paulo. DON and NIV were chosen for this investigation due to their worldwide occurrence. DAS, HT2 and T2 were included due to their high toxicity and their natural occurrence in foods and feeds.

In order to reach the objectives of the present work, a gas chromatography/mass spectrometry method for simultaneous determination of these five trichothecenes was optimized and evaluated. After optimization the method presented detection limits ranging from 20 to 60 ng/g for DON, from 10 to 40 ng/g for NIV, 20 to 120 ng/g for DAS, 20 to 50 for HT2 and from 20 to 100 ng/g for T2, varying according to the tested matrices (dried corn, canned sweet corn, corn grits, corn flour, hominy sweet meal, corn meal and corn flakes). Similarly, the recoveries ranged from 83 to 113% for DON, 84 to 115% for NIV, 69 to 123% for DAS, 82 to 155% for HT2 and 71 to 96% for T2.

A survey was conducted in samples of corn grown in São Paulo State and also in corn-based products commercialized in the city of São Paulo.

Eighty samples of corn from two cooperatives located in the State of São Paulo were analysed. Eleven samples presented traces of NIV and another sample had traces of DON. Besides that, five samples showed levels of NIV ranging from 51 to 106 ng/g and one of them was co-contaminated with 71 ng/g of DON.

Seventy-eight samples of corn-based products commercialized in Sao Paulo city were analyzed. Among these samples, only one sample of corn flour, presented DON and NIV. Another sample of corn grits , had the toxins T2 an HT2 at the levels of 555ng/g and 767 ng/g, respectively.

The results of the two surveys during the years 2000 to 2002, indicated a low occurrence of trichothecenes, and as a consequence a low risk for the consumers. Due to the well known variability in mycotoxins contamination of foods from year to year, only after several years of surveyng corn planted in the State of

São Paulo and corn products commercialized in the city of São Paulo, it will be possible to have a complete picture of the contamination of trichothecenes in corn and corn products.

Key words: trichothecenes, corn, gas chromatography, mass spectrometry,
corn products.

INTRODUÇÃO

As diferentes espécies de *Fusarium* podem produzir diversas micotoxinas como os tricotecenos, a zearalenona e as fumonisinas (MILLER, 1995). Os tricotecenos formam um grupo de mais de uma centena de compostos caracterizados pela presença em suas estruturas do mesmo sistema 12,13-epoxi-tricotec-9-eno. São produzidos por fungos do gênero *Fusarium* e também dos gêneros *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium* e *Verticimonosporium* (SNYDER, 1986). Espécies de *Fusarium* são geralmente bem distribuídas nos vários ambientes, são saprófitas de matéria orgânica em decomposição e também parasitas nas plantas ocasionando podridão em espigas do milho e sarna em trigo.

As condições climáticas estão envolvidas tanto no crescimento dos fungos quanto na produção de micotoxinas. Invernos frios e úmidos, temperaturas médias entre 10 a 15°C e umidade relativa entre 70 e 90%, são propícios para a produção de tricotecenos por *Fusarium* spp (CIEGLER, 1978). No Brasil, as regiões sul e sudeste são as maiores produtoras de milho e possuem condições climáticas que favorecem a produção de toxinas de *Fusarium*.

Alguns tricotecenos já foram isolados e caracterizados como contaminantes naturais em trigo e milho, empregados em alimentos e em rações. Têm sido encontrados o desoxinivalenol (DON), o nivalenol (NIV), a toxina T-2 (T2), o diacetoxiscirpenol (DAS) e, menos frequentemente, os derivados 3-acetil-desoxinivalenol (3ADON) e 15-acetil-desoxinivalenol (15ADON), a fusarenona-X (FX) e a toxina HT-2 (HT2). Destes todos DON é o de maior ocorrência em alimentos e rações animais e também o menos tóxico (WHO, 1990).

Dentre as micotoxicoses relacionadas aos tricotecenos estão a estaquibotriotoxicose e a aleucia tóxica alimentar (ATA). A ocorrência natural de tricotecenos, especialmente toxina T-2, está diretamente relacionada às

micotoxicoses, como no caso da doença dos cavalos no Japão e ATA em humanos e animais na antiga União Soviética (SHARMA & KIM, 1991). O nome ATA se refere à leucopenia causada por ingestão de grãos contaminados com tricotecenos. Os principais efeitos tóxicos relatados são: vômitos, diarreia, anorexia, erupções na pele, leucopenia, além de alterações hematológicas (UENO, 1983; SNYDER, 1986). Os mesmos sintomas foram encontrados quando do consumo de milho, centeio trigo e outros grãos contaminados com *Fusarium* spp. (SHARMA & KIM, 1991). Grãos armazenados, sob flutuações de baixas temperaturas parecem estar mais susceptíveis à produção de micotoxinas de *Fusarium*. A ocorrência sazonal de ATA, sua natureza endêmica, leva a crer que fatores climáticos e ecológicos possuem grande importância na produção de micotoxinas em grãos no campo naturalmente infectados por espécies de *Fusarium* (SHARMA & KIM, 1991).

A determinação analítica simultânea de tricotecenos é dificultada pela ausência de absorvância destes compostos no ultravioleta/visível e fluorescência. Desta forma, há necessidade de uma derivação química para possibilitar uma quantificação. Os métodos analíticos mais usados para os tricotecenos são baseados em cromatografia, seja em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e mais recentemente técnicas imunológicas (ELISA).

Levantamentos de incidência mostram que DON ocorre principalmente em cereais como trigo e milho, mas já foi verificada sua ocorrência em cevada, batata e rações de composição mais complexa (CIEGLER, 1978; TANAKA et al., 1985; SCOTT, 1997). NIV é mais encontrado junto com DON, como co-contaminante, em cereais provenientes da Ásia e Europa. Muitos são os relatos sobre ocorrência de tricotecenos em alimentos e rações nos últimos dez anos. DON e NIV tem sido os tricotecenos mais investigados em nível mundial. Os resultados indicam ocorrência por todo o mundo, em níveis geralmente abaixo de 1 mg/kg (LUO et al., 1992; MCLACHLAN et al., 1992; MOLTO et al., 1997; OKOYE, 1993; PERKOWSKI

et al., 1997; SCOTT, 1997; TANAKA et al., 1988). No Brasil, alguns poucos levantamentos já foram realizados e constataram que o trigo do Brasil pode apresentar contaminação por tricotecenos, bem como o trigo importado (FURLONG et al, 1995 a e b).

Milho é também um dos substratos mais susceptíveis à contaminação por *Fusarium* e alguns estudos já demonstraram este potencial em milho brasileiro (POZZI et al., 1995; CASTRO et al.,1995). Os dados são ainda escassos, principalmente em termos da realidade brasileira. Milho é dos grãos com maior produção no Brasil, ao redor de 30 milhões de toneladas (IBGE,2003), com cerca de 10 milhões de hectares plantados. Uma produção desta ordem é necessariamente de grande impacto na economia brasileira e, portanto, merece cuidadosa monitoração.

A *Food and Agriculture Organization* (FAO, 1997) das Nações Unidas estima que 25% dos alimentos-grãos produzidos estão sujeitos à contaminação por micotoxinas (CHARMLEY et al.,1994). A presença de tricotecenos em milho americano vem causando prejuízos econômicos àquele país. O grão contaminado é classificado como de baixa qualidade provocando recusa alimentar em animais diminuindo a produção animal devido à redução no ganho de peso e redução na fertilidade.

Devido à sua importância para a saúde pública e para a economia mundial os tricotecenos estão entre as micotoxinas priorizadas nos estudos realizados pelo *Joint Committee on Food Additives and Contaminants* (JECFA) do *Codex Alimentarius* .

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

Resumo

As diferentes espécies de *Fusarium* podem produzir diversas micotoxinas, entre elas os tricotecenos. Estas micotoxinas formam um grupo de cerca de mais de uma centena de compostos caracterizados pela presença em suas estruturas do mesmo sistema de anéis tetracíclicos cirpenol. Alguns tricotecenos já foram isolados e caracterizados como contaminantes naturais do trigo e milho, alimentos para humanos e nas rações para animais, como por exemplo desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxina T-2 (T2), diacetoxiscirpenol (DAS) e, menos frequentemente os derivados 3-acetil-desoxinivalenol (3ADON), 15-acetil-desoxinivalenol (15ADON), fusarenona-X (FX) e toxina HT-2 (HT2). Destes todos é DON o de maior ocorrência em alimentos e rações animais e também o menos tóxico. O milho é um dos substratos mais susceptíveis à este tipo de contaminação, porém, em milho brasileiro os dados são ainda escassos. Uma vez que este grão tem grande produção no Brasil, ao redor de 30 milhões de toneladas/ano, e há grande impacto na economia brasileira e portanto merece ser objeto de estudo. Os tricotecenos estão presentes em alimentos e rações em níveis de traços (ng/g) e desta forma requerem para sua detecção e quantificação a utilização de métodos analíticos sensíveis e específicos, como a cromatografia gasosa. A presente revisão traz informações sobre os tricotecenos, fungos produtores, efeitos tóxicos, incidência e métodos analíticos mais utilizados na sua determinação em alimentos e rações.

Palavras – chave: tricotecenos, milho, micotoxinas, *Fusarium*

REVISÃO DA LITERATURA

1. O milho no Brasil

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo, logo depois dos EUA e da China. Sua produção anual está ao redor de 30 milhões de toneladas (IBGE, 2003). Trata-se de uma cultura importante na economia brasileira, sendo este grão plantado em grandes áreas de norte a sul. O milho (*Zea mays* L.) deve a sua importância à sua composição e seu valor nutritivo. O grão de milho é composto de cerca de 60% de carboidrato, basicamente no endosperma, 10% de proteína e 4% de óleo, e este último está mais concentrado no germe do grão (FANCELLI & ALMEIDA LIMA, 1982). Possui uma gama de aplicações tanto na alimentação humana quanto animal. É muito utilizado para preparo de diversos produtos e entre os de maior consumo no Brasil estão a farinha, a canjica e o fubá (MACHINSKI Jr, 2000). Sendo que o fubá comum, canjica, fubá mimoso, quirera empregados para uso na alimentação humana e os farelos para rações, são obtidos pela moagem a seco do endosperma. A diferenciação entre os produtos, além da qualidade do milho usado, está apenas no tamanho da partícula (PALOMINO et al.,1997). O amido de milho é ainda empregado como excipiente na maioria dos comprimidos produzidos por indústrias farmacêuticas.

No Brasil, o milho é cultivado numa área de cerca de 11,6 milhões de hectares, sendo os Estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Santa Catarina e São Paulo, os maiores produtores. A produção anual está ao redor de 25 milhões de toneladas, isto na primeira e principal safra que é colhida de fevereiro à abril. Uma segunda safra, denominada safrinha, é colhida no inverno e é plantada em uma área de cerca de 2 milhões de hectares e produz ao redor de 6 milhões de toneladas de milho por ano. A safrinha vem basicamente dos Estados de São Paulo e Paraná, com contribuições dos Estados da região centro-oeste e Bahia (IBGE, 2003). O milho safrinha é cultivado durante um período de

temperaturas mais baixas (inverno), com poucas chuvas e sob o risco de geadas. Assim sendo, o desenvolvimento da planta é mais lento apresentando uma baixa produtividade além de sofrer com pragas e doenças distintas da safra de verão (CPA, 1993).

2. Tricotecenos

2.1. Estrutura química e estabilidade

Os tricotecenos são micotoxinas que têm em comum um esqueleto tricotecano, que consiste de um ciclopentano, ciclohexano e um anel com seis membros contendo um átomo de oxigênio como pode-se observar na Figura 1 (SHARMA & KIM, 1991).

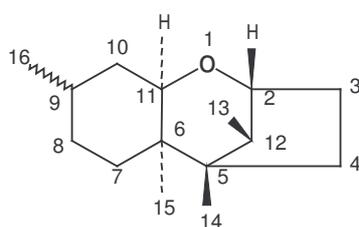


Figura 1- Estrutura proposta do tricotecano

Os tricotecenos possuem estrutura sesquiterpenóide, com uma dupla ligação entre os carbonos 9-10 e um anel epóxido nos carbonos 12-13. O sistema de numeração é mostrado a seguir na Figura 2.

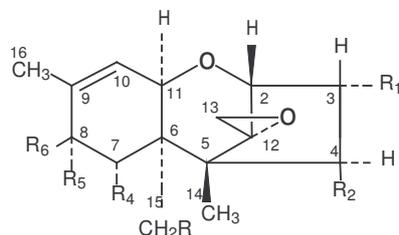
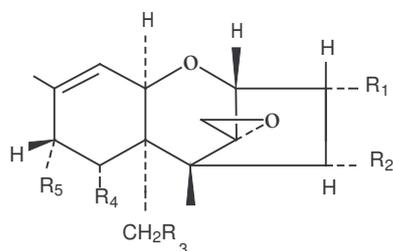


Figura 2 - Estrutura e numeração dos tricotecenos

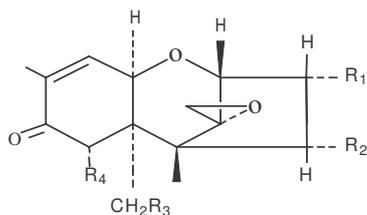
Cerca de 170 diferentes tricotecenos já foram isolados em laboratório mas apenas alguns ocorrem naturalmente (FRISVAD & THRANE,1995). Podem ser divididos em dois grupos, tricotecenos macrocíclicos e não macrocíclicos. Todos os tricotecenos de ocorrência natural possuem pelo menos uma hidroxila no carbono 3 ou 4 ou 7 ou 15 e no geral são divididos em quatro grandes grupos A, B, C e D. No grupo A (Figura 3), estão aqueles que apresentam grupos acilados ou hidroxilas no carbono 8, como cerca de 20 tricotecenos que compõem este grupo, entre eles toxinas T-2 (T2) e HT-2 (HT2), diacetoxiscirpenol (DAS) e neosolaniol (NEO). Os tricotecenos do grupo B apresentam um grupo cetônico no carbono 8, como são o desoxinivalenol (DON) também conhecido por vomitoxina, nivalenol (NIV), e fusarenona X (FX) (MCLACHLAN et al.,1992) (Figura 4). Já os do grupo C são caracterizados por possuírem um segundo anel epóxido no anel A como por exemplo, a crotocina que é produzida por *Cephalosporium crotocinigenum* e tem em sua estrutura um epóxido na posição 7-8 (Figura 5). Os do grupo D são os tricotecenos macrocíclicos, como a roridina A, a verrucarina A e a satratoxina H, que apresentam uma ponte macrocíclica nos carbonos 4 e 16 com ligação éster.



Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Toxina T 2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Toxina HT 2	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Diacetoxiscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H

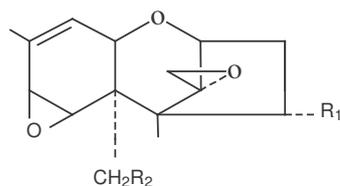
Figura 3 - Estrutura dos tricotecenos do Grupo A

Os tricotecenos de modo geral são cristais incolores, sendo que os do grupo A são solúveis em solventes moderadamente polares, como clorofórmio, éter etílico, acetato de etila e acetona. Os do grupo B dissolvem-se em solventes de alta polaridade, como acetonitrila ou metanol aquoso (WHO, 1990).



Nome	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ñivalenol	OH	OH	OH	OH
Fusarenona X	OH	OAc	OH	OH
Desoxinivalenol	OH	H	OH	OH

Figura 4 - Estrutura dos tricotecenos do Grupo B



Nome	R ₁	R ₂
Crotocina	H	- OCOCH=CHCH ₃

Figura 5 - Estrutura de tricoteceno do Grupo C

Os tricotecenos são estáveis a 120°C, moderadamente estáveis a 180°C e se decompõem a 210°C após 30-40 min (WHO, 2001). Os tricotecenos do grupo A não são estáveis em metanol em temperatura ambiente (WEI & CHU, 1986), sendo acetonitrila e acetato de etila os solventes mais indicados para sua conservação, pelo menos até 24 meses em temperatura máxima de 25°C (WIDESTRAND & PETERSON, 2001). As toxinas DON e NIV, do grupo B, são mais estáveis em acetonitrila e acetato de etila segundo WIDESTRAND & PETERSON (2001). SHEPHERD & GILBERT (1988), ao contrário, concluíram que somente acetato de etila conserva DON com mais estabilidade por um longo período de tempo, isto porque acetonitrila causa decomposição progressiva com tempo de armazenamento superior a 27 meses e temperatura superior a 4°C. Ainda segundo os últimos autores, a combinação metanol/clorofórmio deve ser evitada.

A grande estabilidade dos tricotecenos também é verificada por não serem afetados quando aquecidos sob refluxo com solventes orgânicos, mesmo sob condições levemente ácidas (WHO,1990). Especificamente DON é estável ao calor tanto em pH ácido como neutro. Entretanto em pH básico (pH 10) DON foi totalmente destruído após 15 min (WOLF & BULLERMAN, 1996).

Nos tricotecenos, o grupo epóxi da posição 12, 13 é bastante estável e sua integridade é provavelmente responsável pelos seus efeitos tóxicos (SNYDER, 1986; UENO, 1986). O anel é extremamente estável ao ataque nucleofílico. Entretanto, aquecido à ebulição em condição muita ácida e por muito tempo, ocorre um rearranjo intramolecular transformando-se em um anel apotricoteceno (WHO,1990).

2.2. Microrganismos produtores

Os tricotecenos são produzidos por diferentes gêneros fúngicos tais como *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, entre outros. Estes fungos são também conhecidos como patógenos de plantas produtoras de grãos, como os cereais utilizados na produção de alimentos e rações (UENO, 1983). Os fungos dos gêneros *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Cylindrocarpon*, *Verticimonosporium* e *Phomopsis* estão relacionados à produção de tricotecenos macrocíclicos (grupo D) e os do gênero *Fusarium*, são os que mais produzem tricotecenos não macrocíclicos. Por exemplo, linhagens de *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. acuminatum*, *F. equiseti* e *F. sambucinum* estão mais relacionados à produção de tricotecenos do grupo A, como toxina T-2 e DAS (FRISVAD & THRANE, 1995; VISCONTI et al.,1985). Já os tricotecenos do tipo B (DON, NIV) são produzidos por *F. cerealis*, *F. culmorum* e *F. graminearum*, que por sua vez também podem produzir uma outra micotoxina, a zearalenona (FRISVAD & THRANE, 1995). Os

tricotecenos do grupo C estão associados a poucas espécies, entre elas *Baccharin megapotamica* que produz a bacarina.

Há fungos que produzem tricotecenos tanto do grupo A como do grupo B, como o *Fusarium tricinctum* e *F. graminearum*, que podem produzir diacetoxiscirpenol, toxina T-2, toxina HT-2, nivalenol, desoxinivalenol, 3-acetil-desoxinivalenol (3ADON), neosolaniol e zearalenona (ZEA) (MOLTO et al, 1997). *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. sambicinum*, *F. oxysporum* e *F. poae* podem produzir DON, NIV, acetil-desoxinivalenol (ADON) e FX. *F. crookwellense* pode produzir zearalenona, NIV e 4-acetil nivalenol (4ANIV), também conhecida por fusarenona X (FX). *F. culmorum* e *F. graminearum* produzem uma complexa mistura de tricotecenos que varia de região para região de onde são isolados. Linhagens norte americanas de *F. graminearum* produzem principalmente DON, 15ADON e ZEA. Já linhagens japonesas, australianas e italianas produzem NIV, FX e ZEA ou DON. Algumas linhagens de *F. graminearum* produzem desoxinivalenol a partir do precursor 3-acetilado e outras a partir do precursor 15-acetilado. Linhagens produtoras de desoxinivalenol a partir do precursor 3- acetilado são comuns na Europa e Ásia, enquanto que as linhagens produtoras de desoxinivalenol a partir do precursor 15-acetilado são dominantes na América do Norte e Sul. Linhagens produtoras de nivalenol são comuns em algumas partes da Austrália e da Ásia, como no Japão e na região próxima da Austrália e incomuns nas Américas (MILLER, 1995). De acordo com o descrito observa-se que algumas espécies de *Fusarium* podem produzir vários tricotecenos e inclusive zearalenona simultaneamente, no entanto, *F. nivale*, por exemplo, produz apenas nivalenol (SUGIURA et al, 1993).

2.3. Efeitos tóxicos dos tricotecenos

A aleucia tóxica alimentar (ATA) apresenta como sintomas agudos febre, angina necrótica, leucopenia, hemorragias generalizadas, exaustão da medula

óssea, podendo chegar a óbito (IARC, 1993). A ATA já era conhecida desde o século dezenove na antiga União Soviética (Rússia) (IARC, 1993). Esta doença é causada pela ingestão de pão e produtos feitos a partir de grãos invernados, ou seja, grãos de cereais que foram colhidos com atraso, ficando no campo nos meses de inverno. Foi demonstrado que a doença é causada pelo consumo de grãos contaminados com tricotecenos, mais exatamente a toxina T-2. Milhares de pessoas foram afetadas por este tipo de intoxicação na Sibéria, durante a segunda guerra mundial, levando ao aniquilamento de vilas inteiras (IARC, 1993).

Existem outras doenças relacionadas com a ingestão de grãos contaminados com *Fusarium* sp. Entre estas, a pelagra, que mais recentemente tem sido atribuída ao consumo de milho com T2, e o câncer do esôfago, para o qual existem indicações epidemiológicas de estar relacionado à ingestão de alimentos contaminados com DON (SANCHIS & SANTAMARINA, 1992). Casos de intoxicação no homem e animais atribuídos ao consumo de alimentos contaminados por *Fusarium* têm sido relatados no Japão, Coréia, Rússia, Estados Unidos (CIEGLER, 1978; PATHRE & MIROCHA, 1979; UENO, 1983; SCOTT, 1984; SNYDER, 1986).

Em especial, dois episódios de intoxicação por tricotecenos são bem conhecidos na literatura. No primeiro deles, ocorrido na China entre 1984-1985, provocou 463 casos de intoxicação em humanos que se alimentaram de trigo e milho embolorados. Os sintomas relatados após 5 a 30min da ingestão do alimento contaminado com DON e ZEA foram náusea, vômito, dores abdominais, diarreia, tontura e dor de cabeça (WHO, 2001). O segundo episódio, ocorrido na Cashimira (Índia) em 1987, foi devido ao consumo de pão produzido com farinha embolorada. Os sintomas relatados de 15min a 1h após ingestão do pão foram irritação na garganta, dores abdominais, diarreia, vômito. Os tricotecenos DON, NIV, T2 e ADON foram detectados na farinha utilizada para preparo do pão (IARC, 1993). Outro caso, desta vez envolvendo animais, ocorreu nos Estados Unidos em 1973. O tricoteceno DON, detectado em grãos de milho contaminados com

Fusarium graminearum , provocou vômito ou recusa alimentar em suínos (VESONDER et al.,1973).

A ingestão de grãos contaminados é a principal via de exposição aos tricotecenos, tanto em animais como em humanos. As toxinas T-2 e DAS são do ponto de vista toxicológico as mais potentes, mas não aquelas de maior incidência nos grãos. Por sua vez, o desoxinivalenol (DON) é provavelmente o tricoteceno mais frequente em alimentos e rações. Intoxicação aguda causada pelo DON tem sido observado somente em suínos, tidos como os animais domésticos mais susceptíveis aos efeitos da toxina (WHO, 1990).

A ação tóxica destas micotoxinas é atribuída a inibição da síntese proteica, através da ligação dos seus grupos epóxidos com grupamentos sulfidrilas dos aminoácidos que compõem a peptidil transferase acarretando pelas alterações do sistema hematopoético, linfático e imunodepressão (SNYDER,1986; UENO,1986). Dentre os efeitos tóxicos causados pelos tricotecenos destacam-se o decréscimo da fagocitose, a hipersensibilidade atrasada, a imunossupressão e, frequentemente redução da resistência à infecções. Tanto na toxicidade aguda quanto na crônica observa-se depleção de tecidos linfóides, com desordens no sistema imune e alteração nas respostas do sistema imunológico. Redução nos níveis de anticorpos, imunoglobulina (IgA + IgM) e outros fatores humorais envolvidos no processo de imunidade também são observados. As diferentes toxinas reduzem distintos fatores imunológicos em diferentes espécies (SMITH et al., 1995). Por ordem crescente de citotoxicidade e hemotoxicidade das células humanas estão T2 e DAS > HT2 > DON (PARENT-MASSIN et al., 1994). Estas desordens hematológicas induzidas pelos tricotecenos podem acarretar destruição de células do sangue, como também modificação da hematopoese da medula óssea (PARENT-MASSIN et al., 1994). As toxinas T-2 e DAS produzem efeitos agudos quando administradas experimentalmente a roedores, suínos e gado, seja por via oral, parenteral ou por inalação (suínos e camundongos). Irritação dérmica

tem sido observada na dose de 0,2µg, para a toxina T-2 e de cerca de 10µg, para NIV (WHO,1990).

Os sintomas agudos de envenenamento por tricotecenos são caracterizados por irritação da pele, recusa alimentar, vômito, diarréia, hemorragia, distúrbio neural, aborto e morte. A DL₅₀ (mg/Kg peso corpóreo) para DON em ratos, conforme a raça, varia de 46 a 78 mg/Kg peso corpóreo (pc), via oral, e de 43 a 70 mg/Kg pc, via intraperitoneal. Para aves, a dose oral varia de 27 a 140 mg/Kg pc. A toxicidade de DON varia muito de espécie para espécie animal, porém, os ruminantes parecem ser os menos afetados. KING et al. (1984) investigando transformações de DON por microrganismos do rumen *in vitro*, verificaram que DON sofria redução do grupo epóxido, evidenciando, desta forma, a importância do grupo epóxido tanto na toxicidade quanto na indução ao vômito. Além disso, este metabolito de DON sem o grupamento epóxido foi predominante nas fezes, urina, plasma e leite de vacas lactantes (IARC,1993).

Para as toxinas T-2 e HT-2, os valores de DL₅₀ são inferiores aos de DON. Para T2 a DL₅₀ para camundongos via oral é de 10,5 mg/Kg pc. Para ratos, via intraperitoneal, estes valores oscilam de 0,9 a 2,2 mg/Kg pc, e para aves a dose oral varia de 1,84 a 6,3 mg/Kg pc. A DL₅₀ de T2 para os porquinhos-da-guiné, via oral, é 3,06 mg/Kg pc, 5,2 mg/Kg pc para ratos, de 3,6 mg/Kg pc para aves e 6,1 mg/Kg pc para trutas (UENO, 1983). Para HT2, os valores não são tão diferentes: para camundongos 6,5 mg/Kg pc, via peritoneal, e de 7,2 mg/Kg pc para aves, via oral (WHO, 2001).

A maior parte dos estudos toxicológicos se concentra em DON e T2, mas a tabela a seguir mostra valores de DL₅₀ para os tricotecenos estudados:

Tabela 1 - DL₅₀ intraperitoneal de alguns tricotecenos para ratos

Tricoteceno	mg/Kg peso corpóreo
Nivalenol	4,1
Desoxinivalenol	70,0
Toxina T-2	5,2
Toxina HT-2	9,0
Diacetoxiscirpenol	23,0

Fonte: CIEGLER (1978) e WHO (1990)

Os dados da Tabela 1 mostram NIV como um tricoteceno tão tóxico quanto T2, considerado o mais tóxico dos tricotecenos. Estes valores variam muito com o tipo e raça de animal estudado. De acordo com os resultados apresentados pode-se concluir que dentre os tricotecenos com maior ocorrência nos alimentos, a toxina T2 é a mais tóxica, seguida por DAS e NIV. De acordo com os estudos de toxicidade aguda disponíveis atualmente, o DON é considerado o menos tóxico dentre os tricotecenos (WHO, 1990). No entanto, verificando as várias síndromes e sintomatologia em animais (vômito e recusa alimentar) decorrentes de ingestão de grãos ou rações contaminados por DON e NIV, fica evidente a importância destas duas toxinas com relação à toxicidade crônica (D'MELLO et al.,1999).

Estudos em camundongos não sugerem DON como um carcinógeno (WHO,2001). Com base nos dados atuais de toxicidade e incidência, foi sugerido pelo *Joint Expert Comitee for Food Aditives and Contaminants* (JECFA) do *Codex Alimentarius*, um valor provisório para dose diária máxima tolerada de 1 µg/Kg pc. Valor neste nível não deve produzir efeitos de DON no sistema imune, crescimento e reprodução. O JECFA reconhece que DON pode provocar doenças

agudas em humanos, mas que neste momento não há como se determinar um valor abaixo do qual não se tenha efeitos agudos (WHO,2001).

O JECFA, baseando-se nos vários estudos realizados mundialmente, concluiu que existe evidência substancial de que T2 seja imunotóxica e hematotóxica para várias espécies animais. Ainda com base nestes estudos e usando um fator de segurança de 500 chegou a um valor provisório para dose diária máxima tolerada que é 60 ng/Kg pc. Outra conclusão deste comitê é que os efeitos tóxicos de T2 e HT2 não podem ser diferenciados e que a toxicidade de T2 *in vivo* pode ser em parte devido aos efeitos da toxina HT-2, portanto esta dose é para ambas toxinas, separadas ou combinadas (WHO, 2001). O JECFA recomenda que levantamentos de incidência de toxinas sejam realizados para obtenção de dados que permitam a avaliação da população à exposição a estas toxinas.

THUVANDER et al. (2001) calcularam a dose diária de DON ingerido pela população sueca, expressa em T-2 equivalente. O que denominaram de T-2 equivalente foi calculado como a somatória dos níveis de T2, HT2 e de DON, 3ADON e NIV encontrados nos alimentos suecos, divididos por 5 (cinco), sendo que os três últimos foram divididos por 5 por serem considerados cinco vezes menos potentes que T2 e HT2. A dose diária média encontrada foi de 70 ng/Kg pc para crianças e de 40 ng/Kg pc para adultos. Para grandes consumidores de cereais, a dose diária média variou de 130 a 70 ng/Kg pc.

Efeitos sinérgicos têm sido observados quando da associação de tricoteceno com outras toxinas, tais como T2 e ocratoxina A; DON e moniliformina; T2/DAS e fumonisinas e DON e fumonisinas. Interações entre tricotecenos e fumonisinas causam grande preocupação uma vez que a potencialização dos efeitos dificultam estabelecer valores de tolerância e limites regulatórios (D'MELLO et al.,1999).

2.4. Fatores que afetam a produção de tricotecenos

As diferentes espécies do gênero *Fusarium* se desenvolvem numa faixa ótima de temperatura entre 0 a 35°C e de umidade relativa ótima entre 60 a 90% (SAUER et al.,1992). As espécies do gênero *Fusarium* apresentam distribuição por todo o ambiente, muito comumente encontradas no solo e são consideradas importantes patógenos de plantas. A maioria das espécies invade sementes de cereais e outros tecidos vegetais da planta no campo, causando danos antes da colheita, como podridão das sementes e colmos (MILLS, 1989). Uma das espécies ligadas a estas doenças é o *Fusarium graminearum*, que também é conhecido produtor de DON e NIV. Toxinas de *Fusarium* são, portanto produzidas durante o desenvolvimento e maturação dos grãos.

CIEGLER afirmou em 1978, quando ainda eram poucos os dados sobre ocorrência de tricotecenos no mundo, que fatores climáticos estavam envolvidos na produção destas toxinas, pois, as mesmas ocorriam preferencialmente em grãos cultivados em regiões com períodos frios e úmidos. Entretanto, atualmente sabe-se que o desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas são dependentes de uma série de fatores bióticos e abióticos (JARVIS, 1971; POZZI et al, 1995; FURLONG et al., 1995a). Em situações críticas, como por exemplo, durante a etapa de maturação e o armazenamento dos grãos, a temperatura e a disponibilidade de água representam fatores decisivos.

Fatores abióticos são aqueles independentes da espécie, tais como temperatura, umidade relativa, altitude, latitude, índice pluviométrico, dano mecânico, nutrição mineral, tratamento químico, entre outros. Entre os fatores bióticos encontram-se aqueles relacionados à capacidade toxigênica das diferentes linhagens; características da variedade do vegetal infectado, danos causados por insetos e por doenças nas plantas (JARVIS, 1971).

CHRISTENSEN (1990) dividiu os fungos que crescem em cereais em dois grandes grupos. O primeiro deles é denominado "fungos do campo" e o outro de "fungos do armazenamento". *Fusarium* spp. são considerados fungos do campo como também são *Alternaria*, *Cladosporium* e outros. Eles são assim chamados porque invadem as sementes enquanto as plantas ainda estão crescendo no campo. Na maior parte das vezes estão presentes nas sementes onde vão se desenvolver em ambientes úmidos ou durante a estação chuvosa. Os fungos do campo se caracterizam por precisarem de muita água disponível para seu desenvolvimento, isto é, conteúdo de umidade em equilíbrio com umidade relativa de 90 a 100%, o que significa uma semente de cereal com 20% ou mais de umidade. Esta classificação parece ser bem adequada para climas temperados, mas não para climas quentes e úmidos onde, por exemplo, fungos de armazenamento são encontrados durante o plantio e colheita (WILSON & ABRANSON, 1992). A semente infectada com *Fusarium* spp. no campo pode continuar infectada após a colheita e ainda, produzir micotoxinas se armazenada com umidade alta, mas não se ela estiver seca. Estes fungos, porém, de forma geral, não vão proliferar em ambientes com condições normais de armazenagem (SAUER et al., 1992).

3. Descontaminação de alimentos e rações

Espera-se de um processo de descontaminação que este destrua, inative ou remova a micotoxina, não restando ou produzindo qualquer resíduo tóxico ou carcinogênico/mutagênico nos produtos finais. Também espera-se que o mesmo preserve valores nutricionais e aceitabilidade do produto, não altere significativamente propriedades tecnológicas importantes, destrua micélios e esporos fúngicos para evitar produção de micotoxinas em condições propícias, que considere o efeito no meio ambiente e que seja seguro (SCOTT, 1998).

Os métodos para descontaminação podem ser físicos, químicos, biológicos e microbiológicos. Quanto aos métodos físicos, no que concerne aos tricotecenos, foram feitas algumas tentativas. LAUREN & RINGROSE (1997) estudaram o destino de DON e NIV na moagem do milho por via úmida tendo detectado níveis elevados das toxinas na água de maceração e em concentrações 5 a 10 vezes menores nos substratos sólidos, germe, fibra e glúten. Estudo desenvolvido por SCOTT (1998) avaliou a lavagem de grãos ou culturas de milho com água ou solução de carbonato de sódio. O autor observou diminuição dos teores de micotoxinas de *Fusarium*, entre elas DON. CHARMLEY e PRELUSKY (1994) constataram que, apesar da termoestabilidade dos tricotecenos, a destruição dos mesmos em milho submetido ao tratamento com microondas.

Um outro enfoque foi explorado em testes com adsorventes, os quais adicionados à ração animal para seqüestrar a micotoxina presente no trato gastro-intestinal. Entre os adsorventes, a bentonita apresentou resultados positivos. Constatou-se adsorção da toxina T-2 presente na dieta e inibição de sua adsorção do trato gastro-intestinal (WHO, 2001). O alumínio silicato de sódio e potássio hidratado (HSCAS), derivado de uma zeólita e que protege os animais de aflatoxicoses, não se mostrou eficiente para DON e T2. Outro produto testado, o “Mycofix Plus”, um aditivo para rações da Biomin (Áustria), inativou aflatoxinas por adsorção. Em relação aos tricotecenos DON e T2, o produto provocou a decomposição enzimática do anel epóxido 12-13 (SCOTT, 1998, WHO, 2001).

Quanto aos processos químicos, observou-se que adição de solução de bissulfito de sódio em milho reduz as concentrações de DON pela formação de sulfonato e com isso reduz sua toxicidade para suínos (SCOTT, 1998). Porém, este processo altera as propriedades reológicas da farinha. E quando a farinha é proveniente de trigo tratado com bissulfito, o processo de assar aumenta o teor da toxina, mesmo em pequenas concentrações de DON. Isto pode ser parcialmente explicado pela existência de adutos sulfonato de DON na farinha. Estes adutos

são instáveis em altas temperaturas e pH básico, liberando o DON (SCOTT, 1998).

No que concerne às perdas de tricotecenos no processamento de grãos, estudos envolvendo processamento e moagem dos grãos contaminados com DON mostram pequena redução nos produtos finais. Quanto à toxina T2, seus níveis aumentaram no germe de milho após moagem úmida do grão de milho (SCOTT, 1998).

Estudos efetuados em alimentos, simulando condições de processamento demonstraram que o processo de produção e o cozimento de alimentos, de forma geral, reduziram em cerca de 50% a presença dos tricotecenos. Já a pirólise envolvendo aquecimento de 180 até 210°C, diminuiu a presença dos tricotecenos até praticamente à sua eliminação (KAMIMURA et al., 1979). Entretanto, o efeito das soluções alcalinas é o mais potente, principalmente NaOH 0,01N. KAMIMURA et al. (1979) obtiveram 100% de eliminação das toxinas após 1h desse tratamento em amostras de macarrão japonês e chinês. TANAKA et al. (1986b) verificaram que o processo de moagem de trigo reduzia em cerca de 30% do conteúdo de NIV e 60% de DON, porém o conteúdo no farelo aumentou 2,4 a 3,4 vezes. Os autores também observaram que o cozimento a 170°C por 30 min não afetou os tricotecenos estudados. SCOTT (1998) concorda com estes estudos, o calor não destrói o DON.

Nem sempre o processamento diminui os teores da toxina, algumas vezes ele pode aumentá-los. LEE et al. (1992) analisaram a presença de DON e NIV em todos os estágios do polimento da cevada contaminada. Segundo os autores as citadas micotoxinas estavam presentes no farelo em níveis maiores do que originalmente na cevada não polida e o polimento mostrou-se efetivo na remoção de DON, mas não no de NIV. SCOTT (1998) obteve resultados semelhantes ao constatar que cevada maltada continha mais zearalenona e desoxinivalenol do que a cevada não maltada e que o farelo obtido após polimento da cevada

continha maiores concentrações de DON e NIV do que a cevada polida. Também observou que a massa levedada contem maiores concentrações de DON do que a farinha de trigo usada inicialmente (SCOTT, 1998). No entanto, NEIRA et al. (1997) obtiveram resultados diferentes ao avaliar o conteúdo de DON durante o processo de panificação, observando que houve redução de cerca de 20% de DON após a fermentação. SCOTT (1996) estudou o destino de várias micotoxinas, entre elas DON, durante o processamento da cerveja e verificou que DON é a micotoxina que melhor resiste a todo o processo e sua incidência tem sido alta nas cervejas canadenses e européias. Todos estes resultados mostram que grãos contaminados podem levar esta contaminação para os produtos processados destinados ao consumo humano.

4. Regulamentação da presença de tricotecenos em alimentos e rações

Atualmente apenas dois países possuem limites para tricotecenos em grão, a Rússia e a Romênia (VAN EGMOND, 1989). Os limites russos são 1ppm para DON em trigo duro, 0,5 ppm para outros tipos de trigo e 0,1ppm para toxina T2 em grãos. O limite romeno é de 0,005ppm para DON em ração. O Canadá recomenda 2 ppm de DON para trigo mole e 1ppm para trigo mole destinado para alimentos infantis. Nos EUA, o *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceu como níveis aconselháveis 1ppm para produtos alimentícios a base de trigo destinados ao consumo humano, 10 ppm para grãos e seus produtos destinados a aves e gado com idade superior a 4 meses e 5 ppm para grãos e seus produtos destinados a suínos e outros animais (TRUCKSESS et al.,1995). Na Tabela 2 estão compilados os dados sobre regulamentação de micotoxinas em alimentos e rações em nível mundial.

Tabela 2 - Níveis máximos tolerados de tricotecenos em alimentos e rações

País	Alimento	Tricotecenos	Nível (ng/g)	Observações
Austria	Trigo, centeio	Desoxinivalenol	500	Recomendação
	Trigo <i>durum</i>	Desoxinivalenol	750	Recomendação
Canadá	Trigo <i>soft</i> sem limpeza	Desoxinivalenol	2000	Recomendação
			5000	
	Ração para gado e aves	Toxina HT-2	100	Recomendação
			Desoxinivalenol	
Ração p/suíno/novilhos e animais em lactação	Toxina HT-2	25	Recomendação	
Rações p/animais em reprodução	Todas	0 (zero)	Recomendação	
China	trigo	Desoxinivalenol	1000	Sugestão
Holanda	trigo limpo	Desoxinivalenol	500	Tolerância provisória
			120	Tolerância proposta
Israel	Grãos para ração	Toxina T-2	100	Situação 1991
		Diacetoxiscirpenol	1000	
Romenia	Rações	Desoxinivalenol	5	Tolerância
Rússia	Cereais(trigos tipo duro e forte), farinha, farelo de trigo	Toxina T-2	100	Tolerância
		Desoxinivalenol	1000	
EUA	Produtos de trigo (finais)	Desoxinivalenol	1000	Níveis aconselhados
	Grãos e produtos p/ração de gado maior de 4 meses e p/frangos(não excedendo 50% da dieta)	Desoxinivalenol	10000	
	Grãos e produtos / ração(não excedendo 40% da dieta)	Desoxinivalenol	5000	
	Grãos e produtos destinados à suínos (não excedendo 20% da dieta)	Desoxinivalenol	5000	

Fonte: IARC, 1993; SCHOTHORST & JEKEL, 2001;TRUCKSESS et al.,1995; VAN EGMOND, 1989.

5. Ocorrência de tricotecenos

5.1. Ocorrência em nível mundial

DON é um dos tricotecenos com maior distribuição mundial. Um dos estudos mais abrangentes de ocorrência de DON e NIV foi realizado por TANAKA et al. (1988) e envolveu a análise de 500 amostras de cereais provenientes de 19 países. Os autores encontraram contaminação em cerca de 40-50% das amostras. Foi verificada sua ocorrência em cereais por todo o mundo, Américas do Norte e Sul, Ásia, África e Europa, com exceção daqueles provenientes de áreas muito secas. O NIV juntamente com DON foram os tricotecenos de maior ocorrência em cereais provenientes da Ásia e Europa, mas não naqueles dos EUA e Canadá. E as toxinas, T2, DAS, NIV e DON foram apontadas como contaminantes de rações.

Estudos de incidência mostram que DON e NIV ocorrem nos continentes da Europa, Ásia, América e Oceania e, principalmente, em cereais como trigo e milho e seus produtos, mas já foi verificada sua ocorrência também em arroz, pimentas, cevada, batata e rações de composição mais complexa (CHELKOWSKI & PERKOWSKI, 1992; CIEGLER, 1978; ESKOLA et al.,2001; FERNANDEZ et al.,1994; LAUREN et al.,1991; MÜLLER & SCHWADORF,1993; PARK et al.,1992; PATEL et al.,1996; RAMAKRISHNA et al., 1990; SCHOLLENBERGER et al., 1999; SCOTT, 1997; SCOTT et al.,1989; TANAKA et al., 1986a; TRUCKSESS et al.,1996; VELDMAN et al.,1992; VISCONTI et al.,1986;YOSHIZAWA & JIN, 1995; YUWAI et al.,1994).

Os tricotecenos do grupo A, as toxinas T-2 e HT-2, foram encontradas em trigo do Canadá (SCOTT et al.,1989) e do sul da Alemanha (MÜLLER & SCHWADORF,1993), em produtos à base de trigo na Alemanha (SCHOLLENBERGER et al.,1999), em cevada e aveia na Polônia (PERKOWSKI & BASINSKI, 2002; PERKOWSKI et al.,1997) em níveis ao redor de 5 a 100 ppb. Valores mais elevados da toxina T2, 460 a 1,9 ppm, foram encontrados em algumas amostras de grão de bico, lentilha e feijão na Turquia (OMURTAG & YAZICIOGLU,2001).

Cerveja é um produto que tem sido objeto de interesse. SCOTT et al. (1993) investigaram a presença das toxinas DON e NIV em algumas amostras de cerveja. Estes autores verificaram que DON ocorre frequentemente e que de um total de 29 amostras, 19 apresentaram baixas concentrações da toxina, menos que 5 ng/mL (ppb), e nove delas, de 5 até 50ng/mL. SHIM et al. (1997) também verificaram a presença de DON e NIV em 19% e 85% das cervejas coreanas e em 50% e 58% das importadas, respectivamente, em níveis não superiores a 38 ng/mL. Acredita-se que estas toxinas sejam introduzidas na cerveja pela cevada, mas há a possibilidade de contribuição do milho (SCOTT et al. 1993).

O milho têm sido investigado há décadas por estar ligado à recusa alimentar em animais. Um dos primeiros relatos de recusa alimentar em suínos é de ABBAS et al. (1986). As amostras de milho recusadas e armazenadas entre 1972 e 1973 apresentaram 20 ng/kg (ppm) e 3 ng/kg de DON. Adicionalmente altos valores de 15-acetil-DON foram encontrados, o que pode também ter contribuído para a recusa alimentar.

Muitas vezes é possível relacionar as plantas infestadas com *Fusarium* e a presença de tricotecenos. Na Polônia, GRABARKIEWICZ-SZCZESNA et al. (1996) verificaram que todo o milho infectado com *F. graminearum* e *F. crookwellense* apresentava DON e/ou NIV. PARK et al.(1996) analisaram nos EUA milho embolorado, infectado com várias espécies de *Fusarium* e observaram que mais de 40% das amostras apresentavam de 100 a 1000 ng/g de DON e 17% tricotecenos do grupo A no mesmo nível de contaminação. WANG et al. (1995) avaliaram amostras de milho quanto à presença de aflatoxinas e toxinas de *Fusarium* em amostras do Vietnã do Norte. NIV e DON estavam presentes em seis delas em níveis de 170 a 1365 ppb.

O milho está sujeito à contaminação de tricotecenos dos grupos A e B e pode-se dizer que a distribuição é mundial. Um resumo dos dados mais recentes

de ocorrência mundial de tricotecenos em milho, excetuando o Brasil e América do Sul, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Incidência de tricotecenos em alimentos e rações à base de milho em nível mundial

Toxina	Nível da incidência (ng/Kg)	Incidência %	País	Referência
Desoxinivalenol	3000 - 20000	100 *	EUA	ABBAS et al. 1986
15-acetil -desoxinivalenol	1000 - 16000	100 *		
Desoxinivalenol	50 -1210	100	Transkei-África	SYDENHAM et al. 1990
Nivalenol	880 -15200	100		
Diacetoxiscirpenol, Toxina T-2	não detectado	0		
Nivalenol	100 - 3600	65	Nova Zelândia	LAUREN et al. 1991
Desoxinivalenol	100 - 3500	50		
Desoxinivalenol	20000 - 3919000	100		
15-acetil-desoxinivalenol	25000 – 918000	60	China	LUO et al. 1992
3-acetil - desoxinivalenol	5000 – 121000	44		
Nivalenol	8000 – 68000	84		
Desoxinivalenol	25 - 2159	100	Áustria	SEIDEL et al., 1993
Desoxinivalenol	29 - 2752	30		
15-acetil - desoxinivalenol	22 - 1726	12		
Nivalenol	6 - 366	16	Coréia	KIM et al. 1993
Fusarenona X	23 - 139	5		
4,15-diacetil-nivalenol	17 - 51	7		
Nivalenol	800- 1000	25		
Fusarenona X	3000 - 15000	33	Nigéria	OKOYE , 1993
Toxina HT-2	3000	8		
Desoxinivalenol	4000 - 18800	25		
Desoxinivalenol	22 - 442	93		
Nivalenol	26 - 332	53	Coréia	RYU et al.,1996
Fusarenona X	15 - 72	33		
Desoxinivalenol	20 - 4090	86	Canadá	SCOTT et al., 1997
Desoxinivalenol	21 - 32	12	Indonésia	ALI et al. 1998
Nivalenol	49 - 169	12		
Nivalenol	18 - 102	12	Filipinas	YAMASHITA et al.1995
Desoxinivalenol	1530 - 6510	23,5	Vietnam	WANG et al. 1995
Nivalenol	780 - 1950	12		
Desoxinivalenol	500 - 2700	58	China	GROVES et al.,1999
15-acetil- desoxinivalenol	500 - 700	17		
Desoxinivalenol	10 - 100	23		
15-acetil- desoxinivalenol	2 - 100	17	Coréia	SOHN et al., 1999
Nivalenol	20 - 200	17		
Toxina T-2	510 - 1100	80	Turquia	OMURTAG & YAZICIGLU, 2001

* = apenas duas amostras analisadas

5.2. Ocorrência no Brasil e na América do Sul

No Brasil, poucos são os trabalhos sobre ocorrência de tricotecenos. SABINO et al. (1989), utilizando cromatografia em camada delgada, não detectaram DON em 34 amostras de milho brasileiro e nem nas 16 amostras provenientes dos EUA. Porém, das 70 amostras de trigo e produtos derivados analisadas, duas de farelo de trigo apresentaram 183 ng/g de DON. Ainda em trigo, FURLONG et al. (1995a), usando cromatografia gasosa, avaliaram a ocorrência de DON em 20 amostras de trigo proveniente de São Paulo. Os autores detectaram DON em quatro amostras, com níveis variando de 470 a 590 ng/g, sendo que duas delas também apresentavam toxina T-2 com níveis de 400 a 800 ng/g. Os mesmos autores realizaram outro levantamento com trigo brasileiro, coletado em silos do Rio Grande do Sul no qual o DON foi encontrado em uma das 16 amostras analisadas (400 ng/g) e a toxina T-2 em duas amostras de trigo importado da Argentina, armazenados no mesmo silo, com níveis variando de 350 e 360 ng/g. A toxina T-2 foi detectada junto com DAS em uma delas e com T2 tetraol na outra (FURLONG et al., 1995b). POZZI et al. (1995), analisaram a ocorrência de DON em 130 amostras de milho pós-colheita provenientes de Ribeirão Preto/SP e não detectaram a presença desta toxina em nenhuma amostra analisada. PRADO et al. (1997) utilizando cromatografia em camada delgada e *kits* de imunoenensaio, verificaram a presença de DON e toxina T-2 em 115 amostras grão de milho provenientes do Brasil, Argentina e Paraguai. DON foi detectado em cinco amostras do Paraná (125-542 ng/g) e toxina T-2, juntamente com DON, no nível de 104 ng/g. Duas amostras argentinas também apresentaram DON (102 e 135 ng/g). Mais recentemente, OLIVEIRA et al. (2001) verificaram a incidência de DON, DAS e T2 em milho pipoca cultivado no Estado de São Paulo. Os autores verificaram a presença de DON em 5 das 90 amostras analisadas, com níveis variando de 30 a 770 ppb. OLIVEIRA et al. (2002) pesquisaram a ocorrência de DON em 47 produtos de panificação, farinha e farelo de trigo e detectaram a micotoxina em 32 delas, numa faixa de 40 a 1205 ng/g.

Na Tabela 4 estão os dados de ocorrência de tricotecenos em cereais da América do Sul, incluindo os dados do Brasil.

Tabela 4 - Ocorrência de tricotecenos em cereais da América do Sul

Toxina	Produto	País	Nível (ng/g)	% contaminação	Referências
DON	milho	Brasil	Não detectado	-	SABINO et al., (1989)
DON	milho	Argentina	200-400	24	CHULZE et al., (1989)
DON	trigo	Argentina	50 - 2400	49,6	QUIROGA et al., (1995)
3ADON	trigo		12,2 *	2,3	
T2	trigo		12,7 *	7,7	
HT2	trigo		21,8 *	6,9	
DAS	trigo		78,9 *	~10	
DON	trigo	Brasil	400	8,3	FURLONG et al., (1995a)
DON	trigo pós colheita		470-590	20	
T2	trigo pós-colheita		400-800	10	
DON	trigo	Uruguai	80 - >1000	55	PIÑEIRO et al.,(1996)
	cevada e malte		80 - >1000	42	
	ração		80 - >1000	29	
DON,DAS, NIV,T2,HT 2	trigo e produtos	Brasil	não detectado	-	SOARES; FURLANI (1996)
DON	trigo e produtos	Argentina	300-4500	80	DALCERO et al.,(1997)
DON	trigo	Argentina	100-9250	93	PACIN et al., (1997)
DON	farinha de trigo		250-9000	100	
DON	produtos panificação		200-2800	92,8	
DON	milho pós colheita	Brasil	102-542	~6,1	PRADO et al., (1997)
T2	"		104 (única)	~0,9	
DON	cerveja	Argentina	2-250**	44	MOLTO et al.,(2000)
DON	milho	Brasil	30-770	5,5	OLIVEIRA et al., (2001)
DAS, T2	pipoca		não detectado	-	
DON	Produtos de panificação	Brasil	40-1205	68	OLIVEIRA et al., (2002)

* = valor médio; ** = ng/mL; DON = desoxinivalenol, DAS = diacetoxiscirpenol, T2 = toxina T-2 HT2 = toxina HT-2;

6. Aspectos Analíticos na determinação de tricotecenos

A determinação de tricotecenos possui alguns aspectos que devem ser levados em consideração como, por exemplo, o fato de constituírem uma família muito grande de compostos com estruturas semelhantes e diferentes toxicidades, havendo necessidade de quantificá-los separadamente e muito importante, de confirmar as suas identidades.

Cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia a gás (GC) e métodos imunoenzimáticos tem sido empregados na determinação de tricotecenos (SNYDER, 1986; SCOTT, 1991; WHO, 1990).

Esta família de micotoxinas, em geral, não possui grupos cromóforos em suas estruturas e, desta forma, não pode ser analisada diretamente por colorimetria, espectrofotometria e nem por fluorimetria. Portanto, no caso de CLAE, é necessário introduzir um grupo cromóforo ou fluorescente para que os detectores de UV/visível ou de fluorescência, possam ser usados. No caso de CG a derivação é necessária para melhorar a volatilidade e as propriedades cromatográficas dos tricotecenos. No caso de CCD, o uso de reveladores é imprescindível na análise destes compostos.

6.1. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada foi um dos primeiros métodos utilizados para determinação de tricotecenos em grãos e ainda é usada em alguns laboratórios justamente por ser simples, mais barata e, em certos casos, permitir a determinação simultânea de mais de um tricoteceno (BETINA, 1989; EPPLEY, 1984; GIMENO, 1979; KAMIMURA et al., 1981; TAKITANI et al., 1979; THRANE, 1986). A detecção de tricotecenos requer o uso de substâncias para revelação, tais como para-anisaldeído e ácido sulfúrico, este último empregado na revelação

de tricotecenos dos grupos A (fluorescência azul) e B (coloração marrom). A quantificação pode ser feita por comparação visual ou por densitometria (GIMENO, 1979; KAMIMURA et al.,1981; MAROCHI et al., 1996).

O sistema proposto por MAROCHI et al. (1996) permite a determinação e confirmação da identidade de cinco tricotecenos. Os limites de detecção para os tricotecenos do grupo A, quando revelados com ácido sulfúrico e aquecimento, estão entre 50-100 ng e para os tricotecenos do grupo B, entre 20-50 ng (MAROCHI & SOARES,1993).

TAKITANI et al. (1979) desenvolveram uma metodologia baseada na reação colorimétrica entre 4-(p-nitrobenzil) piridina com o grupo epoxi 12-13 dos tricotecenos, a qual permite a determinação simultânea de seis tricotecenos: NIV, NEO,HT2, T2, FX e DAS.

O uso de ácido cromotrópico como revelador permite a determinação de toxina T2 em material biológico como plasma e urina (KIANAFAR & BALAI, 1992).

Outro reagente revelador usado para tricotecenos do grupo B é o cloreto de alumínio. A placa pode ser preparada com cloreto de alumínio ou pulverizada com este reagente após o seu desenvolvimento, é aquecida a 110°C por 10 min e desta forma DON, NIV e FX exibem fluorescência azul (KAMIMURA et al.,1981;TRUCKSESS et al.,1984; WHO, 1990).

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) tem mostrado uma maior sensibilidade, chegando-se ao limite de detecção de até 40 ng/g para DON (BATA et al.,1984; FERNANDEZ et al.,1994).

6.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

Os tricotecenos não exibem absorção no visível, nem no ultra-violeta (UV) e nem são fluorescentes. A exceção é o grupo B dos tricotecenos, que possui um

grupo carbonila no carbono 8, o que permite uma pequena absorção de radiação ultravioleta em cerca de 220 nm, o que torna possível a sua determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV (CHANG et al, 1984; LAUREN & GREENHALGH,1987). Mesmo assim, há uma grande dificuldade para a quantificação em níveis de ng/g, porque nesta faixa de comprimento de onda há muita interferência, inclusive de solventes e componentes da amostra. Há portanto exigência de uma limpeza excepcional, o que tem levado ao uso de colunas com misturas variadas de adsorventes (resina trocadora de cátions/carvão-alumina/sílica) (LAUREN & GREENHALGH, 1987; TRUCKSESS et al., 1996) e mais recentemente, colunas de imunoafinidade (CAHILL et al., 1999; VISCONTI et al., 1997). Tal aprimoramento na limpeza dos extratos torna possível a determinação de DON em níveis de ppb, inclusive em fluidos biológicos (JANES & SCHUSTER, 2001).

Quanto aos tricotecenos do grupo A, que não apresentam absorção no visível e no UV, nem fluorescência, alguns métodos por CLAE têm sido desenvolvidos, seja usando refratômetro diferencial (detector de índice de refração) (SCHIMDT et al.,1981) ou com derivação com cloreto de *p*-nitrobenzila e detecção UV em 254 nm (MAYCOCK & UTLEY, 1985), ou ainda com derivação com cloreto de 3-carbonil-cumarina ou 1-antróilnitrila, que promovem fluorescência (JIMENEZ et al., 2000; PASCALE et al., 2003). A maior parte destes métodos foi desenvolvida para analisar micotoxinas em extratos fúngicos.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (EM) é uma técnica recente, que vem sendo explorada para os mais diversos fins, entre eles a análise de tricotecenos. BERGER et al. (1999) desenvolveram um método para quantificar e confirmar os tricotecenos dos grupos A e B simultaneamente, usando CLAE e espectrometria de massas, com ionização química positiva. Os limites de detecção variaram de 1 a 10 ppb. Trabalhando com culturas fúngicas, os mesmos autores conseguiram elucidar estruturas dos tricotecenos, utilizando como ferramenta EM/EM.

6.3. Cromatografia a gás

A cromatografia a gás é uma das técnicas mais utilizadas para a determinação de tricotecenos, principalmente os dos grupos A e B que possuem grupamentos que tornam possível a derivação, e consequente determinação por cromatografia a gas (SNYDER, 1986; SCOTT, 1988). Existem três opções em termos de detectores: ionização em chama (DIC), captura de elétrons (DCE) e de massas (DM). Os detectores de ionização de chama não são os mais sensíveis, sendo que o limite de detecção varia de acordo com o tricoteceno e com o tipo de amostra, usualmente na faixa de 75 a 500 ng/g (ppb) para trigo e de 30 a 50 ng/g para milho pipoca (FURLONG & SOARES, 1995; KAMIMURA et al., 1981; OLIVEIRA & SOARES, 2001; SCHOTHORST & JEKEL, 2001). Por sua vez, o detector de captura de elétrons é mais sensível e seletivo e seu limite de detecção é menor, variando de 2 a 100 ppb, além de mostrar melhor repetibilidade (SCOTT, 1982). Uma grande parcela dos estudos envolvendo tricotecenos tem utilizado DCE (CROTEAU et al., 1994; COHEN & LAPOINTE, 1984; KAMIMURA et al., 1981; LAUREN & AGNEW, 1991; ROMER et al., 1978; ROOD et al., 1986; ROOD et al., 1988; SCOTT; KANHERE, 1986; MÖLLER & GUSTAVSSON, 1992; SEIDEL et al., 1993; TACKE & CASPER, 1996; TANAKA et al., 1985; TERHUNE et al., 1984). Os detectores de massa foram inicialmente mais utilizados para confirmação da identidade dos tricotecenos, analisados com DCE e confirmados com espectrometria de massas (COHEN & LAPOINTE, 1984; ROOD et al., 1986; SCOTT et al., 1989; TANAKA et al., 1985). Para os tricotecenos, o processo de identificação é essencial para suas determinações por se constituírem em um grupo de mais de cem compostos e de estrutura semelhante, embora de toxicidade diferente. Os atuais detectores de massas têm, adicionalmente, mostrado maior sensibilidade e a CG-EM é considerada uma técnica quantitativa, utilizada rotineiramente nos laboratórios dos países desenvolvidos. Ela é empregada na grande parte dos trabalhos atuais para a determinação simultânea de tricotecenos (KRISHNAMURTHY & SARVER, 1987; MIROCHA et al., 1983; PERKOWSKI et al., 1997; PLATTNER et al., 1989; ROSEN & ROSEN, 1984;

SCHOLLENBERGER et al.,1998; WREFORD & SHAW, 1987) com limites de detecção variando de 1 a 100 ng/g .

Nos países em desenvolvimento o seu alto custo tem, no entanto, restringido seu uso na rotina, sem levar em consideração que é necessário pessoal treinado. Atualmente existe uma geração de detectores de massas, como o *ion trap*. Este tipo de detector é comercializado com a premissa de que seu manuseio é mais simples e seu custo inferior ao do detector tipo quadrupolo.

Seja qual for a técnica de CG escolhida, um procedimento crucial é a derivação. A derivação aumenta a volatilidade, bem como melhora as propriedades cromatográficas.

Os tricotecnos podem sofrer vários tipos de derivação. As mais citadas na literatura são para éter trimetilsilil (TMS), para ésteres trifluoroacetatos (TFA) e acetatos heptafluorobutiratos (HFB) (CIEGLER, 1978; SCOTT,1982; SNYDER, 1986; WHO,1990). A sililação e fluoroacetilação tem sido muito utilizadas em conjunto com o detector de captura de elétrons.

A sililação substitui, nos tricotecnos, o hidrogênio das hidroxilas por grupos dimetilsilil ou trimetilsilil ou ainda butirilsilil. Os derivados assim obtidos são facilmente preparados e são adequados para detectores de ionização de chama , de captura de elétrons e também para detectores de massa. Porém, a sililação dos tricotecnos do grupo B requer otimização das condições para completa derivação (GILBERT et al., 1985). Na sililação, muitos reagentes foram testados, como por exemplo, bis-(trimetilsilil) acetamida, N-trimetilsililimidazol, trimetilclorosilano (EPPLEY, 1979; LANGSETH & RUNDBERGET, 1998; TACKE & CASPER, 1996; TANAKA et al., 1985). Existem também os preparados comerciais como o Regisil, o Tri-Sil e o Sylon BTZ (GILBERT et al., 1985; MÖLLER & GUSTAVSSON,1992; SCOTT et al., 1986). Na revisão de LANGSETH & RUNDBERGET (1998) os autores citam como grande vantagem da sililação a

estabilidade dos derivados TMS com total ausência de água, que podem ser estocados por até 10 dias a -18°C .

Na fluoroacetilação são introduzidos grupos como trifluorometilacil, pentafluoropropilacil ou heptafluorobutilacil, seja a reação na presença de imidazol ou anidrido. Os compostos resultantes desta derivação podem ser determinados com uso de DCE, pois são bem sensíveis a este tipo de composto e fornecem menores limites de detecção do que os derivados TMS (EPPLEY, 1979; LAUREN & AGNEW, 1991; ROOD et al., 1986; KOTAL et al., 1999; ROMER et al., 1978; SCOTT et al., 1986). Há trabalhos que relatam fluoroacetilação tanto para detectores de ionização de chama (OLIVEIRA; SOARES, 2001) como para os detectores de massas.

Um outro reagente utilizado é o heptafluorobutilimidazol, a derivação pode ser um pouco trabalhosa, mas é completa. Os derivados formados tem massa relativamente alta e isso pode comprometer sua determinação com detector de massas (WHO, 1990). Adicionalmente, observou-se que há degradação dos derivados após 48h (SCOTT et al., 1981). Para detectores de massa são mais utilizadas derivações com anidrido trifluoroacético e anidrido pentafluoropropiônico (KIENTZ & VERWEIJ, 1986; KRISHNAMURTHY & SARVER, 1986; PERKOWSKI et al.; 1997; SCHOLLENBERGER et al., 1998; SCHWADORF & MÜLLER, 1991; WREFORD & SHAW, 1987).

A fluoroalquilação acrescenta grupos do tipo trifluorometil, pentafluoropropil e heptafluorobutil. Esta técnica é preferida seja para DCE, DIC ou ainda com DM, pois os ésteres de TFA são mais voláteis e seus pesos moleculares mais baixos permitem a detecção por espectrometria de massas (KRISHNAMURTHY & SARVER, 1987; MATEO et al. 2001).

Nota-se que é também possível a acetilação com anidrido acético na presença de piridina (SNYDER, 1986).

A derivação deve ser escolhida de acordo com as condições de trabalho, ou seja, que o reagente promova completa derivação, que o derivado seja volátil e que o detector seja sensível a ele.

A CG apresenta maior sensibilidade e especificidade do que a CLAE e seus resultados podem ser confirmados por CG-EM. Porém, a preparação das amostras é longa e trabalhosa e na quantificação é desejável o uso de padrão interno.

Para detecção simultânea de tricotecenos dos grupos A e B é imprescindível a CG com colunas capilares (SCOTT, 1990). SCOTT & KANHERE (1986) compararam fases de colunas capilares de diversas polaridades quanto à separação de tricotecenos dos grupos A e B trimetilsililados e heptafluorobutirados por GC-DCE. Os autores concluíram que a separação total dos tricotecenos dos grupos A e B sililados é muito influenciada pelo tipo de coluna ao contrário dos heptafluorobutirados, sendo que para fases menos polares é praticamente impossível separar totalmente T2 e HT2.

Segundo ONJI et al. (1998), a determinação dos tricotecenos pode também dispensar a derivação. Utilizando injeção *on column* e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas com impacto de elétrons, os autores obtiveram para a cevada um limite de detecção entre 0,1-0,5 µg/g (ppm). As recuperações para amostras com 1µg/g foram 93,1% para DON, 3-ADON, 15-MAS, DAS e T2 e 46% para FX e scirpentriol.

Os testes de confirmação da identidade dos tricotecenos constituem uma das etapas mais importantes da análise. A confirmação pode ser realizada por reações químicas de derivação, por espectrometria de massas ou ainda pelo uso de detectores diferentes. Métodos imunoenzimáticos também podem ser incluídos nesta lista devido a sua especificidade. No entanto, o que mais se observa é o uso de espectrometria de massas para confirmação de suas identidades devido ao seu alto grau de confiabilidade.

6.4. Espectrometria de massas

Segundo MIROCHA et al. (1986), a maior aplicação de cromatografia gasosa e espectrometria de massas na área de micotoxinas está na análise dos tricotecenos. Na literatura encontramos um grande número de tricotecenos, a maior parte deles isolada de culturas de *Fusarium* mantidas em laboratório. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é considerada uma técnica quantitativa e confirmatória também, indicada para confirmação de resultados obtidos por todas as outras técnicas, sejam cromatográficas ou imunoenzimáticas.

A CG-EM pode ser efetuada por dois tipos de ionização: a eletrônica (IE) e a química (IQ). A ionização eletrônica, mais conhecida por impacto de elétrons, é mais simples e muito utilizada. O padrão de fragmentação é, na grande maioria das vezes, determinado pelo impacto de elétrons a 70eV. Em princípio podem ser obtidos espectros idênticos em diferentes tipos de equipamentos de massas desde que a energia dos elétrons seja a mesma. Esta reprodutibilidade levou à compilação de bibliotecas para espectro de IE a 70eV .

A ionização química oferece um método mais suave de fragmentação. Usa-se um fluxo controlado de gás reagente, que pode ser amônia, metano ou isobutano. O gás reagente é introduzido no local da ionização (*íon source*) onde os elétrons térmicos passando pela fonte ionizam o gás reagente. Os íons gerados irão colidir com moléculas neutras havendo transferência de hidrogênio. Este processo é repetido quando os íons do gás reagente colidem com as moléculas do analito. A IQ produz normalmente moléculas protonadas, geralmente com massa de uma unidade maior que a massa molecular do composto. Sob certas condições a IQ produz íons moleculares negativos, formados por captura de elétrons. A sensibilidade do íon negativo para certas classes de compostos pode ter ordem de magnitude maior quando comparada com IQ positiva ou IE. Então há duas técnicas disponíveis: a ionização química positiva e a negativa.

MIROCHA et al (1986) listaram espectros de massas de vários tricotecenos, grupos A e B, derivados trimetilsilil éteres, trifluoroacetato ésteres e heptafluorobutiratos acetatos tanto para IE como para IQ nos modos positivo (IQP) e negativo (IQN). Existe uma preferência para IQP (em metano) pois este proporciona espectro com menos fragmentos. Os fragmentos aparecem em regiões de massas altas além de fornecer o íon molecular. A IQP tem sido utilizada e os limites de quantificação atingidos são da ordem de picogramas (pg) ou ainda em 5 a 40 ng/g (ppb) e quanto à detecção, variando de 1 a 15 ng/g (SCHOLLENBERGER et al.,1998; SCHWADORF & MÜLLER, 1991).

A IQN tem sido pouco utilizada, algumas vezes como método para confirmação da identidade (ROOD et al; 1988), outras para quantificar altos níveis de tricotecenos (maiores que 60 ppm) (MOSSOBA et al.,1996). De acordo com revisão de LANGSETH e RUNDBERGET (1998) ao associar esta técnica ao monitoramento de íons é possível chegar a fentogramas.

Uma vez estabelecido o tipo de ionização a ser utilizado, há duas formas de processar o cromatograma: usando todos os íons/fragmentos (*full scan*) e selecionando pelo menos um fragmento de cada analito, conhecido por monitoramento de íons (simples ou múltiplo), muito conhecido pela sigla em inglês SIM (*single ion monitoring*). Mesmo trabalhando com o total de fragmentos é possível reconstruir o cromatograma com os fragmentos mais importantes o que é uma forma de eliminar íons interferentes e diminuir o efeito matriz.

A grande parte das determinações de tricotecenos por CG-EM utiliza o IE, sendo a preferência pelo modo monitoramento de íons (SIM). O IE com SIM permite limites de detecção de 1 ng/g e de quantificação de até 5 ng/g, dependendo da toxina analisada, limpeza do extrato e derivação utilizada (ESKOLA et al., 2001;MCLACHLAN et al.,1992; PERKOWSKI et al., 1997; ROSEN & ROSEN, 1984; SCOTT et al., 1993; TANAKA et al, 1985; TANAKA et al, 2000; WREFORD & SHAW, 1987).

A confirmação da identidade em CG-EM leva em consideração não apenas o tempo de retenção, mas também a massa específica dos íons e a razão entre suas intensidades (PLATTNER et al., 1989; SCHWADORF & MÜLLER, 1991).

Alguns equipamentos de CG-EM permitem o processo espectrometria de massas/espectrometria de massas (EM-EM). Esta tem sido uma alternativa utilizada em métodos para detecção e triagem de tricotecenos, como por exemplo, em análise de culturas fúngicas e estudos quimiotaxonômicos (NIELSEN & THRANE, 2001; PLATTNER et al., 1989; PLATTNER & BENNET, 1983). A sensibilidade não é elevada, mas a análise é rápida, a limpeza é quase que dispensada porque o ruído químico é mínimo. É muito apropriado para matrizes complexas, porém deve se escolher criteriosamente os íons utilizados (PLATTNER et al., 1989).

A espectrometria de massas pode também estar acoplada à cromatografia líquida (CL/EM) e começa a ser utilizada na determinação de tricotecenos como na toxina T-2 (PASCALE et al., 2003).

6.5. Imunoensaios

Os imunoensaios baseiam-se na interação micotoxina-anticorpo. Como as micotoxinas não são antigênicas, elas precisam ser conjugadas a um polipeptídeo ou proteína para então desenvolver atividade imunizante. No caso dos tricotecenos que não possuem grupo químico que possa ser diretamente conjugado com proteína faz-se necessário a introdução de grupos como as carboxilas. A proteína mais utilizada neste tipo de conjugação é a albumina de soro bovino e além dela, gamaglobulinas e polilisina (FURLONG, 1992).

Métodos imunoquímico, do tipo radioimunoensaio (RIA), começaram a ser desenvolvidos para toxina T-2. Testes imunoquímicos encontram grande aplicação na análise de produtos agrícolas, fluidos orgânicos e em órgãos animais uma vez que o limite de detecção pode atingir de 1 a 20 ng (ABOUZIED et al., 1991;

TESHIMA et al.,1990; TRUCKSESS et al.,1995; WHO, 1990). Testes do tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) têm sido desenvolvidos, como por exemplo, aquele descrito por ITOH et al. (1986) usando anticorpos policlonais para análise de T2 cujo limite de detecção é 5 pg. Atualmente, há no comércio, testes ELISA, usando anticorpos monoclonais e policlonais, para determinação de DON, DAS e T2. Estes métodos têm a vantagem da simples execução e dispensarem as trabalhosas etapas de limpeza requeridas pelas técnicas cromatográficas. Porém, resultados falsos negativos e falsos positivos são possíveis, pois de acordo com ABOUZIED et al. (1991) outros metabólitos de *Fusarium* spp. podem responder positivamente a este teste (reação cruzada com outros tricotecenos). Por outro lado, certos compostos, como por exemplo, flavorizante sabor queijo de pipocas, pode interferir nos teste ELISA resultando falso negativo. SCHUHMACHER et al. (1997) avaliaram resultados de estudo interlaboratorial para determinação de DON em cereais e observaram que os laboratório que usaram testes ELISA não apresentaram resultados com exatidão adequada, mas que a combinação de coluna de imunoafinidade na limpeza dos extratos associada a uma técnica cromatográfica para quantificação produziam excelentes resultados.

A comparação de métodos imunoquímicos com técnicas tradicionais de análise visa esclarecer vantagens e desvantagens. WOLF-HALL & BULLERMAN (1996) comparando CCD e um teste ELISA comercial para quantificação de DON em amostras de milho e trigo, concluíram que o método ELISA proporcionou melhores recuperações, foi muito mais rápido, menos laborioso e não usou solventes orgânicos. Entretanto, observaram também que as amostras devem estar limpas para que não haja interferentes que provoquem fluorescência. Além disso, os autores enfatizaram a importância de se confirmar os resultados por outra técnica como CCD ou CG-EM. ABRAMSON et al. (1998) compararam um teste ELISA comercial com CG-EM, verificando uma boa correlação entre as duas técnicas e, mais uma vez, aconselhando que amostras positivas sejam confirmadas por CG-EM.

Mais recentemente, surgiram trabalhos utilizando técnicas de PCR (*polimerase chain reaction*) (BIRZELE et al., 2000; EDWARDS et al., 2002). PCR tem sido vista como uma técnica muito poderosa que vem revolucionando toda a biologia molecular. Ela permite a amplificação de um fragmento específico do DNA retirado de uma amostra complexa de DNA. O produto resultante pode ser observado por eletroforese em gel e marcado com um corante que se liga ao DNA. Estas técnicas foram usadas com vantagem em estudos taxonômicos para detectar e quantificar fungos micotoxigênicos. Isto porque para detectar estes fungos, eles devem ser isolados e cultivados o que requer um certo grau de conhecimento em taxonomia, ainda mais que alguns fungos como os do gênero *Fusarium* a identificação é muito difícil (EDWARDS et al., 2002).

Estão disponíveis também colunas de imunoafinidade para limpeza dos extratos. Estas colunas são preparadas ligando-se anticorpos específicos de uma micotoxina a um suporte sólido especialmente ativado e conservado suspenso em solução tampão aquosa. A micotoxina, ao entrar em contato com a coluna, liga-se ao anticorpo. As impurezas (co-extrativos não são ligadas e assim podem ser removidas com água ou outra solução. Após a lavagem e remoção das impurezas, a micotoxina é retirada com um solvente miscível como metanol (SCOTT & TRUCKSESS, 1997). Estas colunas podem ser desenvolvidas no próprio laboratório analítico. Algumas estão comercialmente disponíveis para DON e mais recentemente para toxina T-2 (PASCALE et al, 2003). Elas fornecem extratos extremamente limpos porque combinam a imuno especificidade e a separação cromatográfica, permitindo em sequência, a quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência. Outras vantagens das colunas de imunoafinidade são, permitirem automatizar a parte de limpeza das amostras (ANKLAM et al., 2002), rapidez de análise e resultados e menor quantidade de solvente orgânico manipulada pelo analista. As desvantagens incluem custo elevado e não disponibilidade para outros tricotecenos. Baixas recuperações foram relatadas para DON, aflatoxinas G₂ e M₁, possivelmente em virtude de pequena afinidade ou anticorpos insuficientes ligados à coluna (SCOTT & TRUCKSESS, 1997).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS,H.K.; MIROCHA,C.J.; TUIE,J. Natural occurrence of deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, and zearalenone in refusal factor corn stored since 1972. **Applied Environmental Microbiology**, v.51, n.4, p.841-843, 1986.

ABOUZIED, M.M. et al. Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, n.3, p.672-677, 1991.

ABRAMSON, D. et al. *Fusarium* species and 8-keto-trichothecene mycotoxins in Manitoba barley. **Cereal Chemistry**, v.75, n.1, p.137-141, 1998.

ALI, N. et al. Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. **Food Additives and Contaminants**, v.15, n.4, p.377-384, 1998.

ANKLAM, E.; STROKA,J.; BOENKE,A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v.13, p.173-183,2002.

BATA, A. et al. Determination of trichothecene toxins in foods and feeds. **Journal of Chromatography**, v.286, p.357-362, 1984.

BERGER, U.; OEHME, M.; KUHN, F. Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p.4240-4245, 1999.

BETINA, V. Chromatographic methods as tools in the field of mycotoxins. **Journal of Chromatography**, v.447, n.2, p.187-234, 1989.

BIRZELE, B.; PRANGE, A.; KRÄMER, J. Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.12, p.1027-1035, 2000.

CAHILL, L. et al. Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.859, n.1, p.23-28, 1999.

CASTRO, M.F.P.M.; SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P.Z. Mycoflora, Aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study. **Revista de Microbiologia**, v.26, n.4, p.289-295, 1995.

CHANG, H. et al. Rapid determination of deoxynivalenol (vomitoxin) by liquid chromatography using modified Romer column cleanup. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.67, n.1, p.52-54, 1984.

CHARMLEY, L.L.; PRELUSKY, D.B. Decontamination of *Fusarium* mycotoxins. In: MILLER J.D.; TRENHOLM H.L. (Eds). **Mycotoxin in Grain – compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan Press, 1994, cap.11. p.421-435.

CHARMLEY, L.L.; ROSEMBERG, A.; TRENHOLM, H.L. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods, and feedstuffs. In: MILLER J.D.; TRENHOLM H.L. (Eds). **Mycotoxin in Grain – compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan Press, 1994, cap.13. p.471-486.

CHELKOWSKI, J.; PERKOWSKI, J. Mycotoxins in cereal grains (part 15), Distribution of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels. **Mycotoxin Research**, v.8, p.27-30, 1992.

CHRISTENSEN, C.M. Fungi and seed quality . In: D.K. ARORA; K.G. MUJERKI; MARTH, E.H. (Eds). **Handbook of Applied Mycology. Foods and Feeds**. v.3. New York: Marcel Dekker, Inc. 1990, cap. 4, p.99-120.

CHULZE,S et al. Incidence of aflatoxin, zearalenone, and deoxynivalenol on corn in Argentina. **Mycotoxin Research**, v.5, p.9-12,1989.

CIEGLER, A. Trichothecenes: occurrence and toxicoses. **Journal of Food Protection**, v.41, n.5, p.399-403, 1978.

COHEN,H.; LAPOINTE, M. Capillary gas chromatographic determination of T-2 toxin, HT-2 toxin, and diacetoxyscirpenol in cereal grains. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.67, n.6, p.1105-1107, 1984.

CPA. COORDENADORIA DA PESQUISA AGROPECUÁRIA (CPA). Milho safrinha. **Comunicação da Pesquisa Agropecuária**, v.11, n.1,p.25, 1993.

CROTEAU, S.M.; PRELUSKY, D.B.; TRENHOLM, H.L. Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.42, p.928-933, 1994.

DALCERO, A. et al. Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.1, p.11-14, 1997.

D'MELLO, J.P.F; PLACINTA, C.M.; MACDONALD, A.M.C. Fusarium mycotoxins a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v.80, n.3, p. 183-205, 1999.

EDWARDS, S.G.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, D.W. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, v.106, n.9, p. 1005-1025, 2002.

EPPLEY, R.M. Trichothecenes and their analysis. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.56, p.824-829, 1979.

EPPLEY, R.M. DON in winter wheat thin layer chromatographic method and survey. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.67, n.1, p.43-45, 1984.

ESKOLA, M.; PARIKKA, P.; RIZZO,A. Trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone contamination and *Fusarium* infection in Finnish cereal samples in 1998. **Food Additives and Contaminants**, v.18, n.8, p.707-718, 2001.

ESKOLA, M.; RIZZO,A. Sources of variation in the analysis of trichothecenes in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **Mycotoxin Research**, v.17, p.68-87, 2001.

FANCELLI, A.L.; ALMEIDA LIMA, U. de. **MILHO - Produção , Pré-Processamento e Transformação Agroindustrial**. Série Extensão Agroindustrial. São Paulo: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz FEALQ ,n. 5. 1982.112p.

FERNANDEZ, C.; STACK, M.E.; MUSSER, S.M. Determination of deoxynivalenol in 1991 U.S. Winter and Spring wheat by high-performance thin-layer chromatography. **Journal of AOAC International**, v.77, n.3, p.628-630, 1994.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Worldwide regulations for mycotoxins** 1995. A Compendium. FAO Food and Nutrition. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, paper 64, 1997.43p.

FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Mycotoxin production by food-borne fungi. In: SAMSON,R.A.; HOEKSTRA,E.S.; FRISVAD,J.C.; FILTENBORG, O. (Eds.) **Introduction to food-borne fungus** . 4.ed.Baarn, Netherlands: CBS,1995. cap.:4, p.251-260.

FURLONG, E.B. **Tricotecenos em trigo: um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo**. Campinas, 1992. 120p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

FURLONG, E.B.; SOARES, L.M.V. Gas chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. **Journal of AOAC International**, v.78, n.2, p.386-390, 1995.

FURLONG, E.B. et al. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in ten test plots in the State of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.131,p.185-190, 1995a.

FURLONG, E.B. et al. Mycotoxins and fungi in wheat stored in elevators in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.12, n.5, p.683-688, 1995b.

GILBERT, J.; STARTIN, J.R.; CREWS, C. Optimization of conditions for the trimethylsilylation of trichothecene mycotoxins. **Journal of Chromatography**, v. 319, p.376-381, 1985.

GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin, and penitrem A. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.62, n.3, p.579-585, 1979.

GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J.; FOREMSKA, E.; GOLINSKI, P. Distribution of trichothecene mycotoxins in maize ears infected with *F. graminearum* and *F.crookwellense*. **Mycotoxin Research**, v.12, p.45-50,1996.

GROVES, F.D. et al. *Fusarium* mycotoxins in corn and corn products in a high-risk area for gastric cancer in Shandong province, China. **Journal of AOAC International**, v.82, n.3, p.657-662, 1999.

IARC. Some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human**, v. 56, Lyon: IARC,1993, p.467- 488.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. (<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/prtabl>), 06/02/2003.

ITOH, Y. et al. Detection of ochratoxin A and T-2 toxin by one step ELISA. **Proceedings of Japanese Association of Mycotoxicology**, n.24, 1986.

JANES, W.; SCHUSTER, M. Determination of deoxynivalenol (DON) in blood, bile, urine and excrement samples from swine using immunoaffinity chromatography and LC-UV-detection. **Mycotoxin Research**, v.17, n.2, p.88-95, 2001.

JARVIS, B. Factors affecting the production of mycotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v.34, n.1, p.199-213,1971.

JIMÉNEZ, M.; MATEO, J.J.; MATEO,R. Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, n. 870, p.473-481, 2000.

KAMIMURA, H. et al. The decomposition of thricothecenes mycotoxins during food processing (Studies on Mycotoxins in Foods, XII). **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.20, n.5, p.352-357, 1979.

KAMIMURA, H. et al. Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereals, grains, and foodstuffus. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.64, n.5, p.1067-1073, 1981.

KIANIFAR, V.; BALAI,M. Analytical methods for detection and determination of T-2 toxin in biological fluids. VIII Internatiional IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins IUPAC. Mexico city, Mexico. p.62, 1992.

KIENTZ, C.E.; VERWEIJ, A. Trimethylsilylation and trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silica capillary columns. **Journal of Chromatography** , v. 355, p.229-240, 1986.

KIM, J-C. et al. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, n.11, p.3798- 3802, 1993.

KING, R.R. et al. Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.32, n.5, p.1181-1183, 1984.

KOTAL, F. et al. Determination of trichothecenes in cereals. **Journal of Chromatography A**, v. 830, p. 219-225, 1999.

KRISHNAMURTHY, T.; SARVER, E.W. Mass spectral investigations on trichothecene mycotoxins. III. Synthesis, characterization and applications of pentafluoropropionyl and trifluoroacetyl esters of simple trichothecenes. **Journal of Chromatography**, v.355, p.253-264, 1986.

KRISHNAMURTHY, T.; SARVER, E.W. Mass spectral investigations on trichothecene mycotoxins. II. Detection and quantitation of macrocyclic trichothecenes by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.70, n.1, p.132-140, 1987.

LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T. Instrumental methods for determination of non macrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures (review). **Journal of Chromatography A**, n. 815, p. 103-121, 1998.

LAUREN, D.R.; AGNEW, M.P. Multitoxin screening method for *Fusarium* mycotoxins in grains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.39, p.502-507, 1991.

LAUREN, D.R et al. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in cereals grown in New Zealand in 1986-1989. **Food Additives and Contaminants**, v.8, n.5, p.599-605, 1991.

LAUREN, D.R.; GREENHALGH, R. Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by liquid chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.70, n.3, p.479-483, 1987.

LAUREN, D.R.; RINGROSE, M.A. Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins through wet-milling of maize using an improved HPLC analytical technique. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.5, p. 435-443, 1997.

LEE, U-S. et al. Decontamination of *Fusarium* mycotoxins , nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone, in barley by the polishing process. **Mycotoxin Research**, n.8, p.31-36, 1992.

LUO, Y. et al. A survey of the occurrence of *Fusarium* mycotoxins in corn and wheat samples from Shaanxi and Shanxi provinces, China. **Mycotoxin Research**, n.8, p.85-91, 1992.

MACHINSKI Jr, M. **Micotoxinas em cultivares de milho (*Zea mays* L.) e em produtos de milho** : avaliação da ocorrência e fatores que contribuem para a produção no campo. 2000. 185f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2000.

MAROCHI, M.A.; SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P.Z. Testes confirmatórios para tricotecenos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.56, n.2, p.17-20, 1996.

MAROCHI, M.A.; SOARES, L.M.V. Metodologia para determinação de tricotecenos e zearalenona em grãos **Boletim da Sociedade brasileira de Ciência e tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.1-8, 1993.

MATEO, J.J. et al. Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. **Journal of Chromatography A**, n. 918, p. 99-112, 2001.

MAYCOCK, R.; UTLEY, D. Analysis of some trichothecene mycotoxins by liquid chromatography. **Journal of Chromatography** , n. 347, p. 429-433, 1985.

MCLACHLAN, A. et al. Production of trichothecene mycotoxins by Australian *Fusarium* species. **Food Additives and Contaminants**, v.9, n.6, p.631-637, 1992.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v.31, n.1, p.1-16, 1995.

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

MIROCHA, C.J. et al. Mass spectra of selected trichothecenes. In: COLE, R.J. (Ed.) **Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins**. Orlando: Academic Press Inc., 1986, p.353-392.

MIROCHA, C.J. et al. Analysis for *Fusarium* toxins in various samples implicated in biological warfare in southeast Asia. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.66, n.6, p.1485-1499, 1983

MÖLLER, T.E.; GUSTAVSSON, H.F. Determination of type A and B trichothecenes in cereals by gas chromatography with electron capture detection. **Journal of AOAC International**, v.75, n.6, p.1049-1053, 1992

MOLTO, G. et al. Production of trichothecenes and zearalenone by isolates of *Fusarium* spp. from Argentinian maize. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.3, p.263-268, 1997.

MOLTO, G. et al. Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer: a preliminary exposure assessment. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.9, p.809-813, 2000.

MOSSOBA, M.M.; ADAMS, S.; ROACH, J.A.G. Analysis of trichothecene mycotoxins in contaminated grains by gas chromatography/matrix isolation/fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v.79, n.5, p.1116-1123, 1996.

MÜLLER, H-M.; SCHWADORF, K. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* toxins in wheat grown in a southwestern area of Germany. **Mycopathologia**, v.121, p.115-121, 1993.

NEIRA, M.S. et al. The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p. 21-25, 1977.

NIELSEN, K.F.; THRANE, U. Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 929, p. 75-87, 2001.

OKOYE, Z.S.C. *Fusarium* mycotoxins nivalenol and 4-acetyl-nivalenol (fusarenon-X) in mouldy maize harvested from farms in Jos district, Nigeria. **Food Additives and Contaminants**, v.10, n.4, p.631-637, 1993.

OLIVEIRA, A. Q.; SOARES, L.M.V. Avaliação de métodos para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.2, p. 129-134, 2001.

OLIVEIRA, A. Q.; SOARES, L.M.V.; SAWAZAKI, E. Survey of deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol and T2 toxin in popcorn hybrids planted in the State of São Paulo and in popcorn commercialized in the city of Campinas, SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3, p. 330-333, 2001.

OLIVEIRA, M.S. et al. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do Estado de Minas Gerais no período de 1998-2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.61, n.1, p. 1-6, 2002.

OMURTAG,G.Z.; YAZICIOGLU, D. Occurrence of T-2 toxin in processed cereals and pulses in Turkey determined by HPLC and TLC. **Food Additives and Contaminants**, v.18, n.9, p.844-849,2001.

ONJI, Y. et al. Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 815, p. 59-65, 1998.

PACIN, A.M. et al. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and bakery products in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.4, p.327-331, 1997.

PALOMINO, M.E.T.; FONSECA, H.; OETTERER, M. Contaminação e distribuição de aflatoxinas nos produtos e subprodutos do processamento via seca e via úmida do milho. **Boletim da SBCTA**,v.31, n.1, p.77-86, 1997.

PARENT-MASSIN, D.; FUSELIER, R.; THOUVENOT, D. In vitro toxicity of trichothecenes on human haematopoietic progenitors. **Food Additives and Contaminants**, v.11, n.4, p.441-447,1994.

PARK, K-J.; PARK, A-R.; LEE, Y-W. Natural Occurrence of *Fusarium* mycotoxins of the 1990 barley crop in Korea. **Food Additives and Contaminants**, v.9, n.6, p.639-645, 1992.

PARK, J.J.; SMALLEY,E.B.; CHU, F.S. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in field samples from the 1992 Wiscosin corn crop. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, n.5, p.1642-1648, 1996.

PASCALE, M.; HAIDUKOWSKI, M.; VISCONTI, A. Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthroylnitrile. **Journal of Chromatography A**, n. 989, n.2, p. 257-264, 2003.

PATEL ,S. et al. Survey of ethnic foods for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n.7, p.833-841,1996.

PATHRE, S.V.; MIROCHA, C.J. Trichothecenes: natural occurrence and potencial hazard. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.56, p.820-823, 1979.

PERKOWSKI, J.; BASINSKI, T. Natural contamination of oat with group A trichothecene mycotoxins in Poland. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.5, p.478-482, 2002.

PERKOWSKI, J. et al. Natural contamination of spring barley with group A trichothecene mycotoxins in south-eastern Poland. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.4, p.321-325, 1997.

PIÑEIRO, M.S.; DAWSON, R.; COSTARRICA, M.L. Monitoring program for mycotoxin contamination in Uruguayan food and feeds. **Natural Toxins**, v.4, p.242-245, 1996.

PLATTNER, R.D.; BENNET, G.A. Rapid detection of *Fusarium* mycotoxins in grains by quadrupole mass spectrometry/mass spectrometry. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.66, n.6, p.1470-1477, 1983.

PLATTNER, R.D.; BEREMAND, M.N.; POWELL, R.G. Analysis of trichothecene mycotoxins by mass spectrometry and tandem mass spectrometry. **Tetrahedron**, v.45, n.8, p.2251-2262, 1989.

PRADO, G. et al. Ocorrência natural de desoxinivalenol e toxina T-2 em milho pós-colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.259- 262, 1997.

POZZI, C.R. et al. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interactive, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Additives and Contaminants**, v.12, n.3, p.313-319, 1995.

QUIROGA, N. et al. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentine wheat. **Food Control**, v.6, n.4, p.201-204, 1995.

RAMAKRISHNA, Y.; BHAT, R.V.; VASANTHI,S. Natural occurrence of mycotoxins in staple foods in India. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.38, p.1857 - 1859, 1990.

ROMER, T.R.; BOLING, T.M.; MACDONALD, J.L. Gas-liquid chromatographic determination of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.61, n.4, p.801-808, 1978.

ROOD Jr, H.D.; BUCK,W.B.; SWANSON, S.P. Gas chromatographic screening method for T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, and related trichothecenes in feeds. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.71, n.3, p.493-498, 1988.

ROOD Jr, H.D.; SWANSON, S.P.; BUCK,W.B. Rapid screening procedure for the detection of trichothecenes in plasma and urine. **Journal of Chromatography** , v. 378, p. 375-383, 1986.

ROSEN, R.T.; ROSEN, J.D. Quantification and confirmation of four *Fusarium* mycotoxins in corn by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. **Journal of Chromatography** , v. 283, p. 223-230, 1984.

RYU, J-C. et al. Survey of natural occurrence of trichothecene mycotoxins and zearalenone in Korean cereals harvested in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n.3, p.333-341, 1996.

SABINO, M. et al. Determinação de deoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.49, p. 155-159, 1989.

SANCHIS, V.; SANTAMARINA, M.P. Micotoxinas y Micotoxicosis. Riesgos para la salud. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.9, p.46-52, 1992.

SAUER, D.B.; MERONUCK, R.A.; CHRISTENSEN, C.M. Microflora. In: D.B. Sauer (Ed). **Storage of Cereal Grains and their products**. 4ed. St.Paul: American Association of Cereal Chemists, Inc. 1992, cap. 9, p.313-340.

SCHIMIDT, R.; ZIEGENHAGEN, E.; DOSE, K. High-performance liquid chromatography of trichothecenes. I. Detection of T-2 toxin and HT-2 toxin. **Journal of Chromatography**, n. 212, p. 370-373, 1981.

SCHOLLENBERGER, M. et al. Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two stage solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 123-132, 1998.

SCHOLLENBERGER, M. et al. A survey of *Fusarium* toxins in cereals-based foods marketed in an area of southwest Germany. **Mycopathologia**, v. 147, p. 49-57, 1999.

SCHOTHORST, R.C.; JEKEL, A.A. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionization detection. **Food Chemistry**, v.73, p. 111-117, 2001.

SCHUHMACHER, R. et al. Interlaboratory comparison study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol in wheat and zearalenone in maize using different methods. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.359, p. 510-515, 1997.

SCHWADORF, K.; MÜLLER, H-M. Determination of trichothecenes in cereals by gas chromatography with ion trap detection. **Chromatographia**, v.32, n.(3/4), p. 137-142, 1991.

SCOTT, P.M. Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grains products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.65, n.4, p.876-883, 1982.

SCOTT, P.M. Effects of food processing on mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v.47, n.6, p.489-499, 1984.

SCOTT, P.M. Mycotoxins. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.71, n.1, p.70-76, 1988.

SCOTT, P.M. Trichothecenes in grains. **Cereal Food World**, v.35, n.7, p.661-666, 1990.

SCOTT, P.M. Mycotoxins General Referee Reports. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.74, n.1, p.120-128, 1991.

SCOTT, P.M. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **Journal of AOAC International**, v.79, n.4, p.875-882, 1996.

SCOTT, P.M. Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.4, p.333-339, 1997.

SCOTT, P.M. Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.149, n.6, p.543-548, 1998.

SCOTT, P.M.; KANHERE, S.R. Comparison of column phases for separation of derivatized trichothecenes by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v.368, p.374-380, 1986.

SCOTT,P.M.; KANHERE, S.R.; TARTER, R. Determination of nivalenol and deoxynivalenol by electron-capture gas chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.69, n.5, p.889-893, 1986.

SCOTT,P.M.; KANHERE, S.R.;WEBER, D. Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography-mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v.10, n.4, p.381-389, 1993.

SCOTT,P.M.; LAU, P-Y.; KANHERE, S.R.. Gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and other grains. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.64, n.6, p.1364-1371, 1981

SCOTT, P.M et al. Application of capillary gas chromatography to a survey of wheat for five trichothecenes. **Food Additives and Contaminants**, v.6, n.4, p.489-500, 1989.

SCOTT, P.M; TRUCKSESS, M.W. Application of immunoaffinit columns to mycotoxins analysis. **Journal of AOAC International**, v.80, n.5, p.941-949, 1997.

SEIDEL, V. et al. Analysis of trace levels of trichothecenes mycotoxins in Austrian cereals by gas chromatography with electron capture detection. **Chromatographia**, v.37, n.(3/4), p. 191-201, 1993.

SHARMA, R.P.; KIM, Y.-W. Trichothecenes. In: R.P SHARMA. and D.K. SALUNKHE (Eds). **Mycotoxins and Phytoalexins**, Boca Raton: CRC Press, Inc.1991, cap.13, p.339-359.

SHEPHERD, M.J.; GILBERT, J. Long-term storage stability of deoxynivalenol standard reference solutions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.36, p.305-308, 1988.

SHIM, W-B. et al. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Korean and imported beers. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.1, p.1-5, 1997.

SMITH, J.E. et al. Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. **Natural Toxins**, v.3 , n.4, p.187-192, 1995.

SNYDER, A.P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecenes mycotoxins mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v.49, n.7, p.544-569, 1986.

SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P.Z. Survey of mycotoxins in wheat and wheat products sold in health food stores of the city of Campinas, State of São Paulo. **Revista de Microbiologia**, v.27, n.1, p.41-45, 1996.

SOHN, H-B. et al. Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea. **Food Additives and Contaminants**, v.16, n.4, p.153-158, 1999.

SYDENHAM, E.M. et al. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalent areas of Transkei, Southern Africa. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.38, p.1900 - 1903, 1990.

SUGIURA, Y. et al. *Fusarium poae* and *Fusarium crookwellense*, a fungi responsible for the natural occurrence of nivalenol in Hokkaido. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, n.10, p.3334- 3338, 1993.

TACKE, B.K.; CASPER, H.H. Determination of deoxynivalenol in wheat, barley, and malt by column cleanup and gas chromatography with electron capture detection, **Journal of AOAC International**, v.79, n.2, p.472-475, 1996.

TAKITANI, S. et al. Spectrodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine on silica gel thin-layer chromatograms. **Journal of Chromatography**, v.172, p.335-342, 1979.

TANAKA, T. et al. A survey of the occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in foodstuffs and health foods in Japan. **Food Additives and Contaminants**, v.2, p.259-265,1985.

TANAKA, T. et al. A limited survey of *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in 1984 UK harvested wheat and barley. **Food Additives and Contaminants**, v.3, n.3, p.247-252,1986a.

TANAKA, T. et al. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.36, p.979-983, 1988.

TANAKA, T. et al. Residues of *Fusarium* Mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone, in wheat and processed food after milling and baking. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.27,n.6, p.653-655, 1986b.

TANAKA, T. et al. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.882, p.23-28, 2000.

TERHUNE, S.J. et al. Improved gas chromatographic method for quantitation of deoxynivalenol in wheat, corn and feed. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.67, n.6, p.1102-1104, 1984.

TESHIMA, R. et al. Radioimmunoassay of nivalenol in barley. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.3, p.764-768, 1990.

THRANE, U. Detection of toxigenic *Fusarium* isolates by thin layer chromatography. **Letters in Applied Microbiology**, v.3p.93-96, 1986.

THUVANDER,A. et al. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. **Food Additives and Contaminants**, v.18, n.8, p.696-706, 2001.

TRUCKSESS, M.W.; NESHEIM, S.; EPPLEY, R. Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.67, n.1, p.40-43, 1984.

TRUCKSESS, M.W. et al. Determination and survey of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour, and bran. **Journal of AOAC International**, v.79, n.4, p.883-887, 1996.

TRUCKSESS, M.W. et al. Survey of deoxynivalenol in US 1993 wheat and barley crops by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of AOAC International**, v.78, p.631-636, 1995.

UENO, Y. Trichothecene: chemical, biological and toxicological aspects. In: UENO, Y. (Ed.). **Development in Food Science**. Tokyo: Elsevier Press. 1983,v.4, 326p.

UENO, Y. Trichothecenes as environmental toxicants. **Review in Environmental Toxicology 2**, Amsterdam, p.303-341, 1986.

VAN EGMOND, H.P. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. **Food Additives and Contaminants**, v.6, p.139-188, 1989.

VELDMAN, A. et al. Occurrence of mycotoxins ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol in feed components. **Food Additives and Contaminants**, v.9, n.6, p.647-655,1992.

VESONDER, R.F.; CIEGLER, A.; JENSEN, A.H. Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. **Applied Microbiology**, v.26, n.6, p.1008-1010, 1973.

VISCONTI, A. et al. Trichothecene mycotoxins produced by *Fusarium sporotrichioides* strain P-11. **Mycotoxin Research**, v.1, p.3-10, 1985.

VISCONTI, A.; CHELKOWSKI, J.; BOTTALICO, A. Deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol – mycotoxins associated with wheat head fusariosis in Poland. **Mycotoxin Research**, v.2, p.59-64, 1986.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; AMADÉ, P.L.S. Impiego di minicolonne ad immunoaffinità nell'analisi di deossinivalenolo (vomitossina) in campioni di frumento. **Bollettino Chimico Igienico**, v.48, p.127-131, 1997.

WANG, D-S. et al. Natural co-occurrence of *Fusarium* toxins and aflatoxin B₁ in corn for feed in North Vietnam. **Natural Toxins**, v.3, p. 445-449, 1995.

WEI, R-D.; CHU, F.S. Instability of some trichothecenes in methanol. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.69, n.5, p.902-903, 1986.

WIDESTRAND, J.; PETTERSON, H. Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants. **Food Additives and Contaminants**, v.18,n.11, p.987-992, 2001.

WILSON,D.M.; ABRAMSON,D. Mycotoxins. In Sauer,D.B. (Ed.) **Storage of Cereal Grains and their products**. 4ed. American Association of Cereal Chemists,Inc. St.Paul, Minesota,USA, 1992, chapter 10. p.341-391.

WOLF-HALL, C.E.; BULLERMAN, L.B. Comparison of thin-layer chromatography and na enzyme-linked immunosorbent assay for detection and quantification of deoxynivalenol in corn and wheat. **Journal of Food Protection**, v.59, n.4., p.438-440, 1996.

WOLF, C.E.; BULLERMAN, L.B. Heat and pH after the concentration of deoxynivalenol in an aqueous enviroment. **Journal of Food Protection**, v.61, n.3., p.365-367, 1998.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health Criteria 105. **Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot**. IPCS (International

Programme on Chemical Safety). Geneva: World Health Organization.1990, cap.2, p. 71-164.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food.** FAO Food and Nutrition Paper 74. Prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva: World Health Organization. 2001. 701p.

WREFORD, B.J.; SHAW, K.J. Analysis of deoxynivalenol as its trifluoroacetyl ester by gas chromatography-electron ionization mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v.5,n.2, p.141-147, 1987.

YAMASHITA, A. et al. *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins in corn from southeast Asia. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.59, n.9, p.1804-1807, 1995.

YOSHIZAWA, T.; JIN, Y-Z. Natural occurrence of acetylated derivatives of deoxynivalenol and nivalenol in wheat and barley in Japan. **Food Additives and Contaminants**, v.12,n.5, p.689-694, 1995.

YUWAI, K.E. et al. Occurrence of nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone in imported cereals in Papua, New Guinea. **Natural Toxins**, v.2, p.19-21, 1994.

Capítulo 2

OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE TRICOTECENOS EM MILHO POR CROMATOGRAFIA A GÁS ASSOCIADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

RESUMO

Tricotecenos são micotoxinas produzidas por diferentes espécies de *Fusarium*. Estas micotoxinas formam um grupo de cerca de mais de uma centena de compostos caracterizados pela presença, em suas estruturas, do mesmo sistema de anéis tetracíclicos cirpenol. Alguns são contaminantes naturais em trigo e milho, como o desoxinivalenol (DON), o nivalenol (NIV), a toxina T-2 (T2), o diacetoxiscirpenol (DAS) e a toxina HT-2 (HT2). No presente trabalho foram avaliados e otimizados sistemas de limpeza, extração e derivação para determinação simultânea de DON, NIV, DAS, HT2 e T2 em amostras de milho por cromatografia a gás associada à espectrometria de massas (CG/EM). A extração com acetonitrila : água (84+ 16) seguida de limpeza com coluna MycoSep 227 apresentou os melhores resultados para as cinco toxinas estudadas. A derivação com anidrido trifluoroacético / bicarbonato de sódio mostrou-se melhor tanto para a detecção como para a quantificação dos tricotecenos estudados por CG/EM. As recuperações obtidas variaram de 83 a 105,7% para DON, 84,6 a 114,5% para NIV, 52,1 a 122,7% para DAS, 71,1 a 92,9 % para T2 e de 81,8 a 155,4 % para HT2. Os limites de detecção variaram de 20 a 50 ng/g para DON, de 10 a 40 ng/g para NIV, de 30 a 120 ng/g para DAS, de 20 a 50 ng/g para HT2 e de 20 a 100 ng/g para T2. Os limites de quantificação variaram de 70 a 300 ng/g para DON, de 50 a 200 ng/g para NIV, de 60 a 300 ng/g para DAS, de 50 a 250 ng/g para HT2 e de 70 a 500 ng/g para T2. A repetibilidade do método mostrou desvios padrão relativos (DPR) variando de 4,8 a 18,1 para DON, 3,5 a 13,4 para NIV, 3,8 a 35,7 para DAS, 3,3 a 16,0 para HT2 e de 5,0 a 33,6 para T2.

INTRODUÇÃO

Tricotecenos são micotoxinas de ampla ocorrência em cereais. Isolados e caracterizados como contaminantes naturais em trigo e milho, estão o desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxina T-2 (T2), diacetoxiscirpenol (DAS) e toxina HT-2 (HT2). Todos produzidos exclusivamente por espécies de *Fusarium* (UENO, 1983). Dentre todos, o DON é o de maior ocorrência em alimentos e rações animais e também o menos tóxico (TANAKA et al., 1988; IARC, 1993). O milho é um dos substratos mais susceptíveis a este tipo de contaminação, porém os dados sobre a ocorrência de tricotecenos em milho brasileiro são ainda incipientes.

Os tricotecenos apresentam efeitos tóxicos tais como vômito, angina necrótica, diarréia e anorexia (SNYDER, 1986; UENO, 1986). Ainda, a presença de toxina T2 em grãos está relacionada à doença humana chamada Aleucia Tóxica Alimentar (ATA) (WHO, 1990).

A detecção e determinação destas micotoxinas deve ser realizada por métodos sensíveis e específicos, pois além de ocorrerem em níveis de ng/g (ppb), constituem também um grupo de estruturas muito semelhantes exigindo métodos que além de as separar, também confirme suas identidades. Inicialmente foi utilizada a cromatografia em camada delgada auxiliada por agentes reveladores (MAROCHI et al., 1996). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem sendo usada para tricotecenos do grupo B, os quais apresentam uma pequena absorção no ultravioleta permitindo o emprego deste tipo de método. Já para tricotecenos do grupo A, técnicas de derivação tem sido empregadas para determiná-los por CLAE (PASCALE et al, 2003). Atualmente a cromatografia a gás é uma das técnicas mais utilizadas, principalmente acoplada à espectrometria de massas. A cromatografia a gás, devido à sua capacidade superior de resolução, permite a separação e a determinação simultânea de tricotecenos dos grupos A e

B. No entanto, esta técnica requer, em geral, etapas de limpeza mais trabalhosas, envolvendo frequentemente partição em conjunto com colunas de extração de fase sólida.

Os sistemas de extração de tricotecnos utilizam misturas de solventes polares, como acetonitrila e metanol, misturados com água. No processo de clarificação, um dos precipitantes mais utilizados é o sulfato de amônio e se a amostra for gordurosa, faz-se uma etapa extra de desengorduramento, seja com hexano ou isoctano. Para limpeza são muito utilizadas colunas de extração de fase sólida e os adsorventes utilizados são os mais variados. Entre eles, carvão ativo, Celite, alumina e Florisil (ROMER, 1986; FURLONG & SOARES, 1995; MAROCHI, 1993).

O processo de derivação se faz necessário quando se utiliza a CG, pois reduz a polaridade de grupamentos livres, aumenta a volatilidade e melhora as propriedades cromatográficas dos analitos. Aumentando a pressão de vapor, introduzindo grupos que tornam o composto adequado para o sistema de detecção e, além de tudo, possibilitando a separação de substâncias muito semelhantes entre si no seu estado natural. Para os, tricotecnos as derivações mais usuais são a siliilação, a fluoroacetilação e a fluoroalquilação (FURLONG, 1992; KIENTZ & VERWEIJ, 1986; LANGSETH & RUNDBERGET, 1998) .

Neste trabalho foram avaliados e otimizados sistemas de extração, limpeza e derivação para determinação simultânea de DON, NIV, DAS, HT2 e T2 utilizando cromatografia a gás associada à espectrometria de massas. A metodologia otimizada foi avaliada intralaboratorialmente através da verificação da recuperação, repetibilidade e limite de detecção para os tricotecnos estudados em milho e produtos de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras: amostras de um quilograma de milho (*Zea mays*) e produtos de milho (farinha de milho, canjica, milho verde em lata, sêmola, quirera, fubá e flocos de milho) provenientes do Estado de São Paulo foram analisadas. As amostras foram moídas até 16 mesh (1,00 mm), embaladas em sacos plásticos duplos e armazenadas em congelador a -18°C até o momento da análise. A água presente em algumas amostras de milho verde em lata foi escoada antes que o milho fosse triturado, embalado e armazenado.

2. Padrões

2.1. Tricotecenos: padrões de desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas T2 (T2) e HT2 (HT2) foram obtidos da SIGMA (St. Louis, MO, EUA). As soluções estoques, variando de $100\ \mu\text{g/mL}$ a $220\ \mu\text{g/mL}$, foram preparadas individualmente. As concentrações foram calculadas de acordo com as massas obtidas por diferença de massas dos respectivos frascos com e sem a toxina. Para tal utilizou-se uma balança analítica com precisão de $\pm 0,01\ \text{mg}$. As soluções de trabalho variaram de 30 a $70\ \mu\text{g/mL}$ e também de cerca de $1\ \mu\text{g/mL}$, sendo que DON e NIV foram diluídos em acetonitrila e DAS, T2 e HT2 em metanol. As soluções foram acondicionadas em frascos apropriadamente fechados, protegidos da luz e armazenados em congelador a -18°C .

2.2. Padrões interno avaliados: alfa-cloralose (SIGMA, St. Louis, MO, EUA). Solução estoque de $400\ \mu\text{g/mL}$ em metanol e solução de trabalho de $80\ \mu\text{g/mL}$ em metanol. Metil araquidato (Poly Science Corp., State College, PA, EUA). Solução estoque de $500\ \mu\text{g/mL}$ em n-hexano e solução de trabalho $100\ \mu\text{g/mL}$ em n-hexano. Ambas acondicionadas em frasco âmbar a -18°C . Todos os solventes usados apresentavam grau cromatográfico.

3. Solventes e Reagentes: cloreto de potássio (KCl), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 4-dimetil-aminopiridina, fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), sulfato de sódio anidro [Na₂SO₄], sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄], todos grau analítico, exceto quando indicado. Solventes grau analítico usados no preparo da amostra: acetonitrila, metanol, tolueno, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano. Solventes grau cromatográfico usados no preparo dos padrões e dos extratos finais das amostras: acetonitrila, metanol, tolueno, acetato de etila, n-hexano, benzeno, diclorometano. Reagentes para derivação: n-trimetilsililimidazol, trimetilclorosilano, anidrido trifluoroacético, 4-dimetil amino piridina, imidazol, todas da SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO, EUA) e anidrido pentafluoropropiônico da Pierce (Rockland, IL, EUA).

4. Colunas para limpeza das amostras: colunas de extração de fase sólida MycoSep™ 225 e 227, Romer Labs (Union, MO, EUA), que contêm basicamente uma mistura de carvão ativo, Celite e óxido de alumínio. A diferença entre elas está na quantidade do empacotamento, a coluna 227 tem o dobro da 225.

5. Equipamentos

Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas, modelo GCQ da Finnigan MAT (Austin, TX, EUA) com *ion trap* usando impacto de elétrons. Processador de dados XCALIBUR 1.1 (San Jose, CA, EUA). Coluna capilar Rtx-5MS (5% difenil-95% dimetil polisiloxano) com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura de fase estacionária (Restek Corporation, Bellefonte, PA, EUA). Injetor *splitless*, volume de injeção, 1 µL e tempo de *splitless*, 1 min. Velocidade linear do gás, 40 cm/s. Condições fixadas para o GCQ: modo *full scan* (cromatograma com os íons totais - TIC) e cromatograma do íon reconstituído

(RIC) para quantificação. Energia de ionização: 70 eV. Temperatura da fonte de íons: 200°C e da linha de transferência (*transfer line*): 275°C.

O detector foi calibrado de acordo com especificações do fabricante (manual THERMO Finnigan – Polaris Q Hardware Manual, revisão B p. 3-42). As massas indicadas para calibração usando o gás perfluorobutilamina (PFTBA) também conhecido por FC-43, foram de m/z 50 a 650: m/z 69 = 54% ± 20%; m/z 131 = 100%; m/z 264 = 45 ± 20%; m/z 414 = 8% ± 5%; m/z 502 = 6% ± 4% e m/z 614 = 0,7% ± 0,5%.

Liquidificador: 12-speed blender Osterizer (OSTER, Sunbeam, Inc., Boca Raton, FL, EUA) ou equivalente.

Evaporador rotatório: TE 120 , ou equivalente (MARCONI, Piracicaba, SP, BR).

Moinho-liquidificador: Vita-mix *Blending station* – modelo VMO115A (Vita Corp Mix, Cleveland, OH, EUA) ou equivalente.

Bloco aquecedor com evaporador: sistema e-vap 12 portas, 1301 Stylemaster (Romer Labs, Inc., Union, MO, EUA) com bloco aquecedor (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EUA) ou equivalente.

Ultrassom: Thornton modelo 17 (Thornton – INPEC, SP/BR) ou equivalente.

Vortex: Fischer *Touch Mixer* modelo 231 – 2800rpm (Fisher Scientific, Pittsburg, PA,EUA) ou equivalente.

Pipetas automáticas: *transferpette* digital de 20 a 200 µL, de 100 a 1000 µL e de 0,5 a 5 mL (BRAND, Wertheim, Mainz, Alemanha) ou equivalentes.

Micro-seringa: modelo 701N, de 10 µL (Hamilton Co., Reno, NA, EUA)

6. Avaliação de sistemas de derivação: foram testados três tipos de derivação dos grupos hidroxilas dos tricotecenos: sililação com trimetilsililimidazol (TMSI), fluoracetilação com anidrido trifluoroacético (TFAA) e com anidrido pentafluoropropiônico (PFPA), com a finalidade de verificar resolução e sensibilidade dos tricotecenos para detecção com espectrometria de massas.

6.1. Sem derivação: embora a maior parte dos trabalhos sobre tricotecenos envolva análises cromatográficas com derivação química, existe a opção de não derivar e usar a injeção direta. Com base no procedimento de ONJI et al. (1998), foram determinados tricotecenos sem derivação química e usando cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas. As condições do instrumento foram: temperatura do injetor 240°C, programação da temperatura do forno iniciando-se com 80°C/0,20 min, 22°C/min até 210°C/0,25 min, 6°C/min até 300°C. Gás hélio com fluxo constante de 40,0 cm/s e injeções de 1 µL. As condições fixadas para o espectrômetro de massas foram: modo *full scan*, energia de ionização de 70 eV, temperatura da fonte de íons 200°C e da linha de transferência 275°C. Programa de integração dos dados foi o Xcalibur 1.1. Foram realizadas injeções diretas dos padrões de tricotecenos: desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxina T2 (T2) e toxina HT-2 (HT2).

6.2. Derivação com trimetilsililimidazol (TMSI): alíquotas de solução padrão e de padrão interno foram secas à 40°C sob fluxo de nitrogênio. O procedimento de sililação seguido foi o de TANAKA et al. (1985). Foram adicionados 200 µL da mistura de n-trimetilsililimidazol (TMSI), trimetilclorosilano e acetato de etila (1:0,2:9) ao resíduo. Após 20 min em temperatura ambiente (cerca de 25°C), adicionou-se 2800 µl de acetato de etila à mistura. Após a homogeneização foi realizada a injeção no cromatógrafo. A sililação exige muito cuidado na manipulação porque se ocorrer qualquer resquício de umidade, nos frascos, por exemplo, pode-se perder toda a análise.

6.3. Derivação com anidrido pentafluoropropiônico (PFPA): técnica utilizada no “Istituto de Tossine e Micotossine” em Bari na Itália de acordo com o estágio realizado em 1998 (KRISHNAMURTY & SARVER, 1986; LANGSETH & RUNDBERGET, 1998; ROOD Jr et al., 1988). A uma alíquota de solução padrão e de padrão interno, seca à 40°C sob fluxo de nitrogênio, foi adicionado 1 mL de benzeno ao resíduo. A solução obtida foi evaporada sob fluxo de nitrogênio. Foram adicionados 500 µL da mistura tolueno-acetonitrila (85+15, v/v) contendo imidazol 0,4 M, seguido de 100 µL de PFPA. As soluções foram misturadas e derivadas por 1h a 60°C em bloco aquecedor. Em seguida, a solução foi resfriada até cerca de 25°C e foram adicionados 500 µL de hexano. A fase orgânica foi lavada com 1 mL de solução de bicarbonato de sódio 5% e em seguida com 1 mL de água. A fase aquosa foi removida e a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro. A fase orgânica foi transferida para outro frasco seco e 1 µL desta fase foi injetado no cromatógrafo.

6.4. Derivação com anidrido trifluoroacético (TFAA): para este sistema de derivação foram testadas duas bases, bicarbonato de sódio e dimetil amino piridina.

Reação em presença de 4-dimetil amino piridina (DMPA) (ARMSTRONG et al, 1998): uma alíquota de cada solução padrão de tricoteceno e de padrão interno foram reunidas e secas à 40°C sob fluxo de nitrogênio. Ao resíduo foram adicionados 1 mL de solução de 4-dimetil amino piridina (DMPA) 1,5 mg/mL da mistura tolueno: acetonitrila (95+5, v/v) e 200 µL de TFAA. O frasco fechado foi colocado em agitador tipo *Vortex*. A derivação foi realizada a 60°C por 30 min. Após derivação, atingindo a temperatura ambiente, foi adicionado 1mL de solução de KH₂PO₄ 5%, fosfato de potássio monobásico 5%, para remover o excesso de reagente e deixar a solução levemente ácida conferindo maior estabilidade aos derivados. O frasco fechado foi submetido a um agitador tipo *Vortex*. Após à separação das camadas, a camada superior foi removida e transferida para um segundo frasco contendo 1 mL de KH₂PO₄ 5% recém preparado. Após outro

período de agitação, a fase superior foi transferida para um frasco limpo, tomando-se cuidado para não retirar a fase aquosa junto, e 1µL desta fase foi injetado no cromatógrafo.

Reação em presença de bicarbonato de sódio: a derivação com anidrido trifluoroacético (TFAA) foi conduzida de acordo com o método de SCHWADORF & MULLER (1991) e modificado por SCHOLLENBERGER et al. (1998). Uma alíquota de cada solução de padrão de tricoteceno e de padrão interno foram reunidas e secas a 40°C sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em 1mL de metanol, com breve sonificação, para garantir ambiente ausente de umidade e evaporado em bloco aquecedor a 40°C sob corrente de nitrogênio. Ao resíduo seco foram adicionados 200 µL de TFAA e cerca de 20 mg de bicarbonato de sódio. O bicarbonato (base fraca) foi usado aqui como receptor de ácidos visando aumentar o rendimento de DON e NIV derivados. O frasco foi fechado, agitado por 10s e levado ao bloco aquecedor a 80°C por 30 min. Após atingir temperatura ambiente, o frasco foi aberto e evaporado até secura sob nitrogênio. O resíduo foi ressuspenso com 100 µL de tolueno, com agitação manual e ultrassom por 1min. Foram acrescentados 400 µL de água deionizada e após cerca de 15 min, a fase superior de tolueno foi transferida para outro frasco onde foram adicionados cerca de 5-10 mg de sulfato de sódio anidro. Após 15 min, a fase de tolueno foi transferida para outro frasco seco e 1 µL da mesma foi injetado no cromatógrafo.

7. Avaliação de padrão interno: foram testadas duas substâncias para uso como padrão interno, o éster metílico do ácido araquídico, utilizado por FURLONG & SOARES (1995) e QUEIROZ (2001), e a alfa-cloralose, recomendado por Michele Solfrizzo (comunicação pessoal), também utilizado em alguns trabalhos (LANGSETH & RUNDBERGET, 1998; SCHOTHORST & JEKEL, 2001).

8. Avaliação de sistema de extração e limpeza: para escolha da melhor forma de extração e limpeza do extrato, as amostras de produtos de milho foram enriquecidas com 0,5 µg/g de DON, NIV, DAS, T2 e HT2. Nesta etapa, o objetivo foi a obtenção de cromatogramas limpos com poucos picos interferentes e conseqüentemente a recuperação dos tricotecenos.

8.1. Teste do sistema de extração e limpeza de OLIVEIRA & SOARES (2001) utilizando coluna MycoSep 225 : extração de 50 g de amostra foi executada com 270 mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4% aquoso, por 5 min em liquidificador. Do extrato filtrado foi tomada uma alíquota de 150 mL para clarificação com 150 mL de sulfato de amônio 30% aquoso. Após clarificação e filtração, foi tomada outra alíquota de 150 mL a qual foi transferida para um funil de separação já contendo 150 mL de água destilada. Duas partições com 15 mL de diclorometano foram realizadas. As fases orgânicas foram reunidas e em seguida foi retirada uma alíquota de 15 mL que foi levada à secura a 50°C sob corrente de nitrogênio (N₂). O resíduo foi levado a uma segunda etapa de limpeza em coluna de extração de fase sólida, neste caso foi utilizada a coluna MycoSep 225. O resíduo seco foi redissolvido em 8 mL da mistura acetonitrila:água (84:16,v/v) e transferido para tubo de cultura de vidro. A coluna MycoSep foi inserida como um êmbolo neste tubo. A coluna (êmbolo cujo interior é o recheio da coluna) foi empurrada através do tubo, forçando o extrato a passar pelo recheio e ser coletado no reservatório acima da coluna até se atingir cerca de 6cm acima da parte superior da coluna. Foram coletados 4 mL do eluato e evaporados a 80°C. O extrato seco foi então submetido à derivação.

8.2. Teste do sistema de extração e limpeza preconizado por Romer Labs Inc. usando coluna MycoSep 225 : com base no método GC 2002 versão 941 (Romer Labs, Inc) foram pesados 25 g da amostra triturada e homogeneizada e

transferidos para um copo de liquidificador. Ao copo foram adicionados 100 mL de uma mistura de acetonitrila/água (84+16, v/v) e colocados em agitação forte por cinco minutos. A mistura foi deixada em repouso por alguns minutos para separação do extrato do substrato e, então foi colhida uma alíquota de cerca de 6-8 mL para tubo de cultura de vidro, de forma a preencher cerca de 2/3 do tubo. A coluna MycoSep 225 foi inserida como um êmbolo neste tubo. A coluna (êmbolo cujo interior é o recheio da coluna) foi empurrada através do tubo, forçando o extrato a passar pelo recheio e ser coletado no reservatório acima da coluna até se atingir cerca de 6cm acima da parte superior da coluna. Uma alíquota de 4 mL do extrato limpo do reservatório da coluna foi colhida e transferida para um frasco de vidro âmbar seco e sililado onde foi evaporada à secura sob fluxo de nitrogênio. A seguir foi executada a derivação.

8.2.1. Teste de extração usando concentração do extrato da amostra antes da limpeza em coluna MycoSep 225: com o intuito de aumentar a sensibilidade do método foi testada uma etapa de concentração do extrato. Para tal foram tomadas 25 g da amostra triturada e homogeneizada, transferidas para um copo de liquidificador e agitadas fortemente por cinco minutos com 100 mL de uma mistura de acetonitrila/água (84+16, v/v). Após a agitação foram retiradas alíquotas de 50, 30 e 20 mL que foram evaporadas em evaporador rotatório à vácuo a 60°C até cerca de 5 mL. A concentração do extrato anterior à passagem pela coluna já havia sido utilizada por SCHOTHORST & JEKEL (2001). Apesar de se tratar de uma mistura com água, o processo de concentração é facilitado devido ao baixo ponto de ebulição desta solução azeotrópica (RADOVÁ et al., 1998). As alíquotas foram transferidas para tubo de cultura de vidro e o volume completado para 8 mL com acetonitrila:água (84+16, v/v). A limpeza foi levada a cabo em uma coluna MycoSep 225. Foram transferidos 4 mL do extrato purificado para frasco de vidro sililado âmbar e foi executada a derivação com anidrido trifluoroacético.

8.2.2. Teste de extração usando coluna MycoSep 227: o mesmo procedimento descrito em 8.2. foi realizado com uma coluna MycoSep 227 (Romer Labs.).

9. Recuperação, repetibilidade e limites de detecção e quantificação: testes de recuperação foram conduzidos com cinco repetições, em amostras diversas, livres de tricotecenos, artificialmente contaminadas com 0,5 µg/g do padrão de cada tricoteceno estudado (DON, NIV, DAS, T2 e HT2).

A repetibilidade do método foi avaliada calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) do resultado da análise de cinco (5) amostras de milho contaminadas artificialmente com 0,5 µg/g de cada tricoteceno.

Os limites de detecção foram determinados nas condições de trabalho, baseando-se nas recomendações de TAYLOR (1987), sendo verificadas as concentrações dos tricotecenos que originaram picos com um sinal pelo menos três vezes o desvio padrão, e ainda, que o espectro deste pico fosse inequívoco, ou seja, espectro coincidente em cinco fragmentos escolhidos. Os limites de quantificação foram as menores quantidades que produzissem sinais cinco vezes maiores que os limites de detecção.

As curvas de calibração foram construídas com uso do padrão interno, aquele escolhido após a avaliação, e uma para cada tricoteceno estudado. Elas estão em função da área relativa, isto é, área do tricoteceno/área do padrão interno pela concentração do tricoteceno. A linearidade das curvas de calibração foi determinada pela análise cromatográfica de padrões derivados em concentrações decrescentes.

10. Confirmação dos resultados: a confirmação foi obtida pelo tempo de retenção e pelo espectro referente ao pico cromatográfico obtido, utilizando-se cinco fragmentos mais característicos e a razão da intensidade entre eles (SCHWADORF & MÜLLER, 1991).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Escolha do melhor sistema de derivação: com o objetivo de se utilizar cromatógrafo gasoso com sistema e detecção por espectrometria de massas, avaliou-se qual o melhor agente de derivação e condições para tricotecenos em milho.

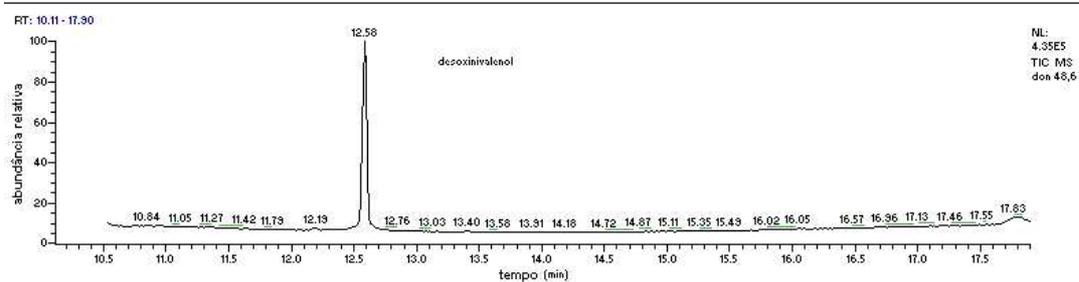
1.1. Sem derivação: os tricotecenos podem ser detectados e quantificados com e sem derivação. Pode-se observar na injeção direta sem derivação a presença de todos os tricotecenos, inclusive os seus respectivos espectros de massa, com resposta qualitativa para todos eles (Figuras 1 a 5).

1.2. Derivação com trimetilsilil imidazol (TMSI) (Sililação): na Figura 6 encontra-se o cromatograma da mistura dos tricotecenos sililados estudados. A programação de temperatura que produziu a melhor resolução para os tricotecenos foi: injetor a 260°C; programação do forno: 80°C/0,20 min, até 205°C a 18°C/min, 205°C/0,25 min, e até 270°C a 2°C/min. Tempo total de corrida: 39,89 min; fluxo constante, velocidade 40,0 cm/s.

A sililação é um processo de derivação utilizado principalmente para os tricotecenos do grupo B, neste caso temos DON e NIV (MIROCHA et al., 1986). Suas hidroxilas reagem mais prontamente aos reagentes sililantes do que para uma trifluoroacetilação. Mesmo assim apareceram muitos fragmentos na região de massas mais baixas. Os resultados obtidos foram bons e exibiram maior sensibilidade do que aqueles do processo sem derivação. Porém pode-se observar que os tricotecenos T2 e HT2 apresentaram tempos de retenção muito próximos, e não foram totalmente resolvidos (Figura 6).

D:\amostras\don 48,6

08/14/00 02:34:51 PM



don 48,6 #136 RT: 12.57 AV: 1 NL: 1.32E4
T: + c Full ms [50.00-300.00]

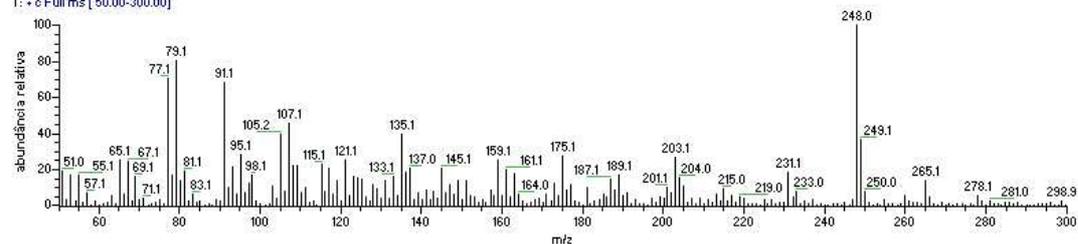


Figura 1 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 48,6 ng de desoxinivalenol (DON) sem derivação e seu respectivo de espectro de massas obtido em modo *full scan* (m/z 50-300) (70eV) utilizando-se coluna Rtx-5MS ,30 m x 0,25 mm e 0,25 μ m de espessura de fase estacionária (Restek Corp.,PA)

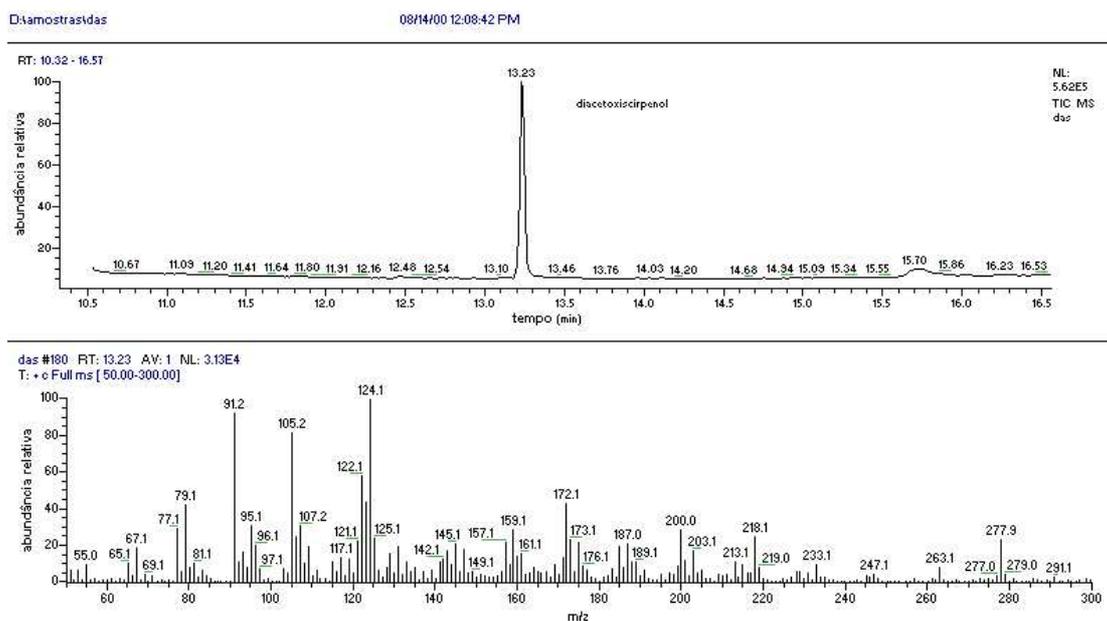
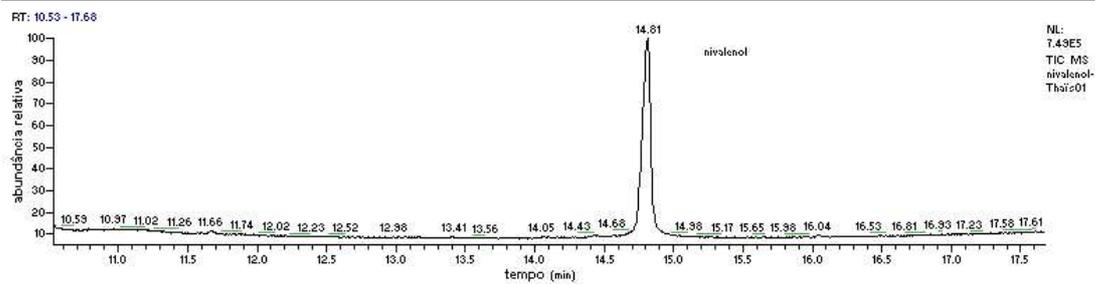


Figura 2 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 130 ng de diacetoxiscirpenol (DAS) sem derivação e seu respectivo de espectro de massas obtido em modo *full scan* (m/z 50-300) (70eV) utilizando-se coluna Rtx-5MS ,30 m x 0,25 mm e 0,25 μ m de espessura de fase estacionária Restek Corp.,PA)



nivalenol-Thais01#655 RT: 14.81 AV: 1 NL: 7.04E4
T: + e Full ms [35.00-320.00]

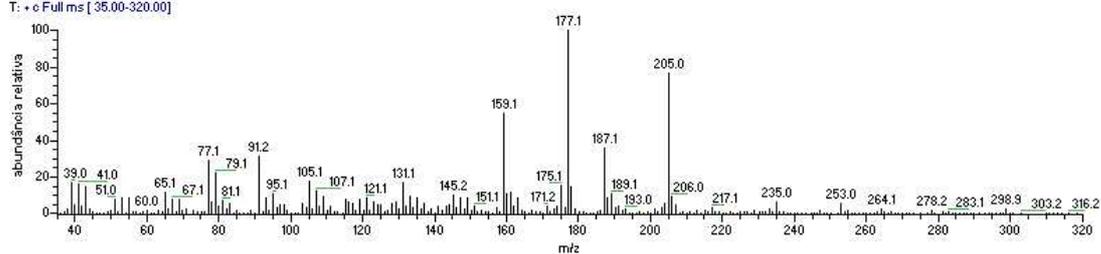


Figura 3 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 41,7 ng de nivalenol (NIV) sem derivação e seu respectivo de espectro de massas obtido em modo *full scan* (m/z 50-320) (70eV) utilizando-se coluna Rtx-5MS ,30 m x 0,25 mm e 0,25 μ m de espessura de fase estacionária (Restek Corp.,PA)

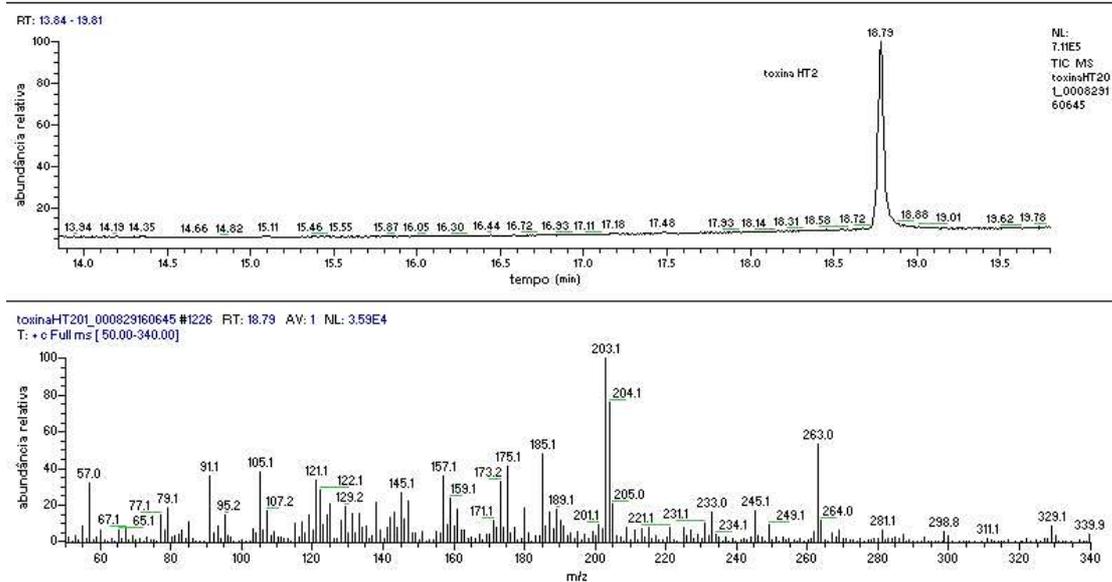


Figura 4 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 73 ng de toxina HT-2 (HT2) sem derivação e seu respectivo de espectro de massas obtido em modo *full scan* (m/z 50-300) (70eV) utilizando-se coluna Rtx-5MS ,30 m x 0,25 mm e 0,25 μ m de espessura de fase estacionária (Restek Corp.,PA)

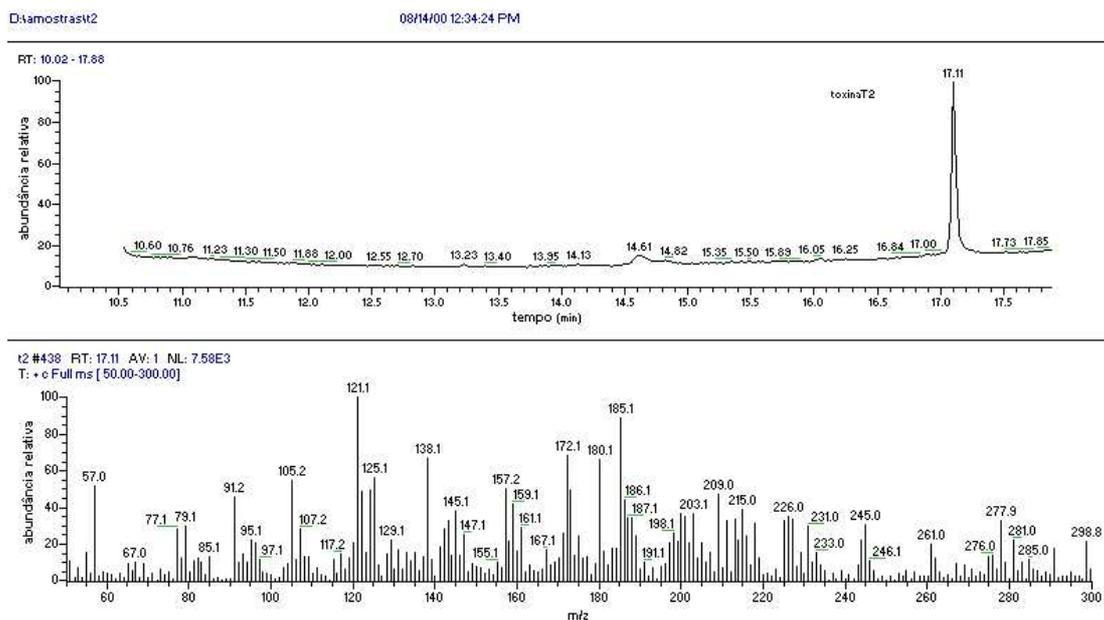


Figura 5 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 43 ng de toxina T-2 (T2) sem derivação e seu respectivo de espectro de massas obtido em modo *full scan* (m/z 50-300) (70eV) utilizando-se coluna Rtx-5MS ,30 m x 0,25 mm e 0,25 μ m de espessura de fase estacionária (Restek Corp.,PA)

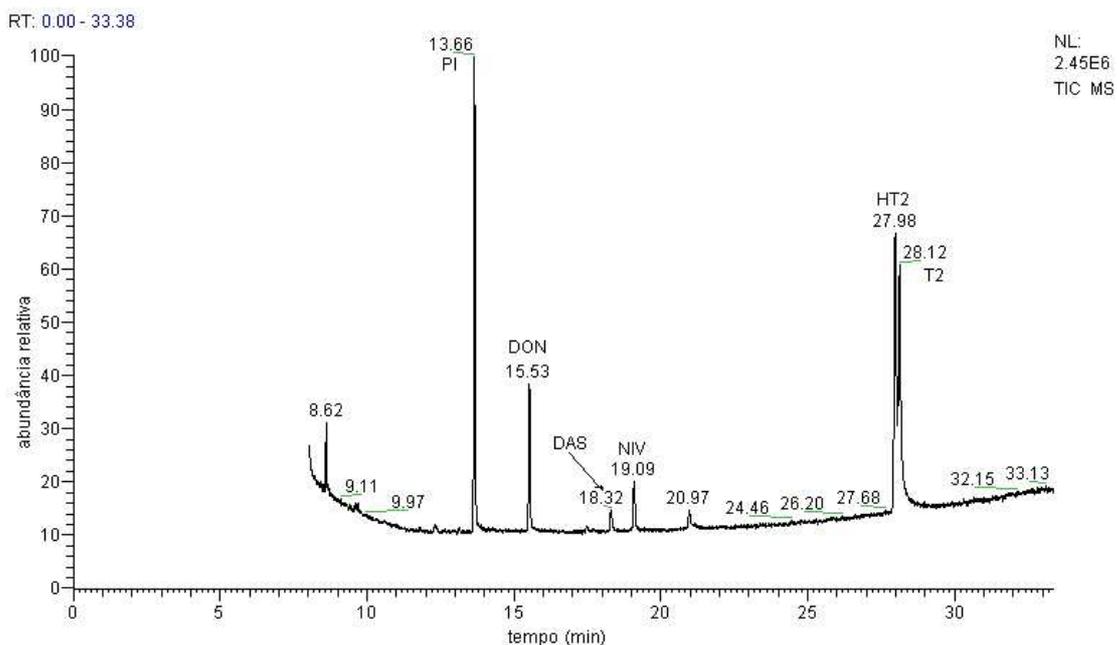


Figura 6 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 2,4 ng de desoxinivalenol (DON), 2,1 ng de nivalenol (NIV), 2,2 ng de diacetoxiscirpenol (DAS), 22 ng de toxina HT-2 (HT2) e 10 ng de toxina T-2 (T2), todos siliados, utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 μ m de espessura de fase estacionária (Restek Corp.,PA). Programação: 80 °C/0,20 min, para 205 °C a 18 °C/min, 205 °C/0,25 min, até 270 °C a 2 °C/min.

As Figuras 7 a 11 mostram os espectros de massas dos tricotecenos DON, NIV, DAS, HT2 e T2 siliados. Os tempos de retenção dos tricotecenos derivados e

sem a derivação estão apresentados na Tabela 1 e na Tabela 2 estão os fragmentos mais característicos.

Tabela 1 – Tempos de retenção de tricotecenos cromatografados com e sem derivação

TRICOTECENOS	TEMPO DE RETENÇÃO DOS TRICOTECENOS (min)		
	sem derivação	com sililação	com fluoracetilação
Desoxinivalenol	12,58	11,11	8,69
Nivalenol	14,81	12,63	7,49
Diacetoxiscirpenol	13,23	12,35	14,15
Toxina T2	17,11	16,08	23,48
Toxina HT2	18,79	16,04	17,35

NOTA: programação para tricotecenos sem derivação: injetor a 240°C; programação do forno: 80°C/0,20 min, até 210°C a 22°C/min, 210°C/0,5 min, e até 300°C a 5°C/ min.

programação desta sililação: injetor a 240°C; programação do forno: 80°C/0,20 min, até 210°C a 22°C/min, 210°C/0,25 min, e até 300°C a 6°C/ min.

programação da fluoroacetilação: injetor a 260°C; programação do forno: 80°C/0,20 min, até 205°C a 22°C/min, 205°C/0,25 min, e até 270°C a 2°C/ min.

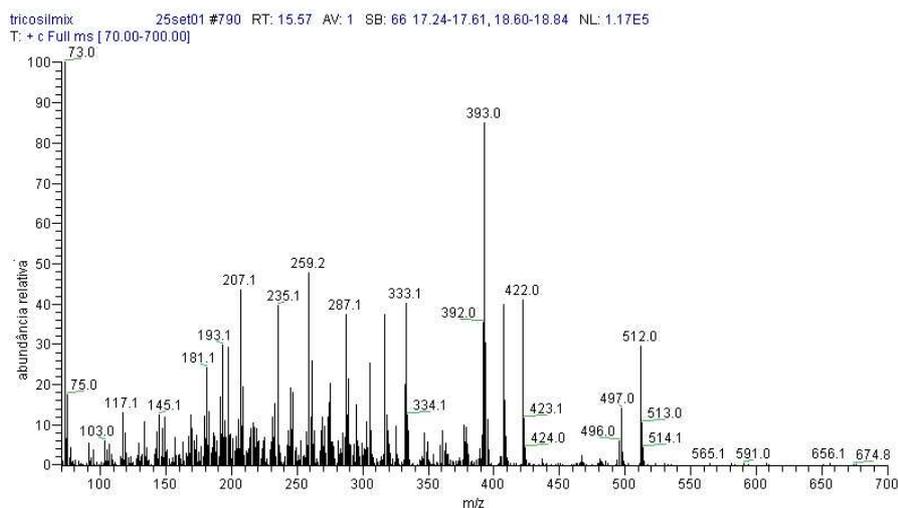


Figura 7 – Espectro de massas de desoxinivalenol sililado (70 eV)

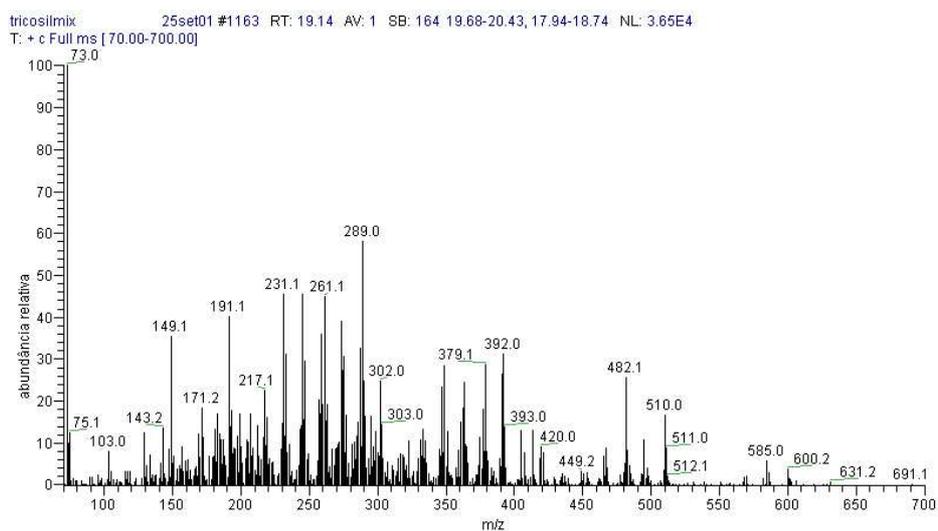


Figura 8 – Espectro de massas de nivalenol sililado (70 eV)

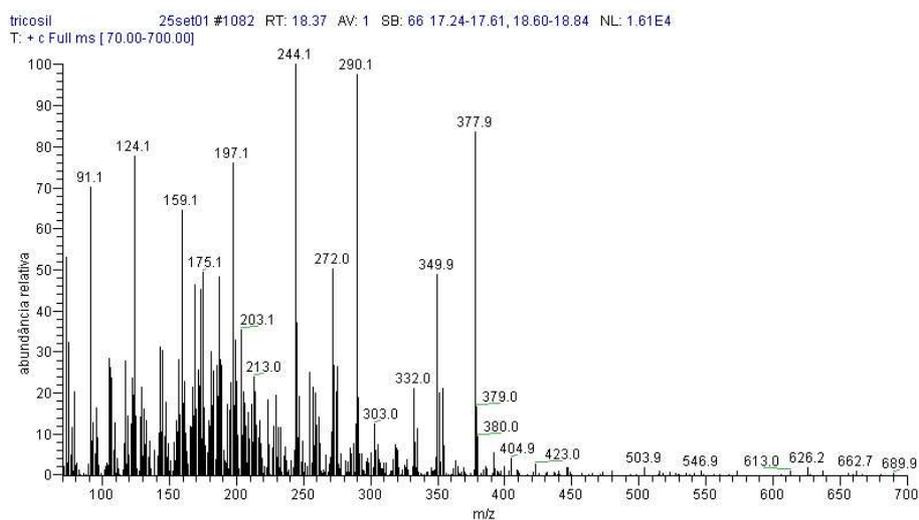


Figura 9 – Espectro de massas de diacetoxiscirpenol sililado (70 eV)

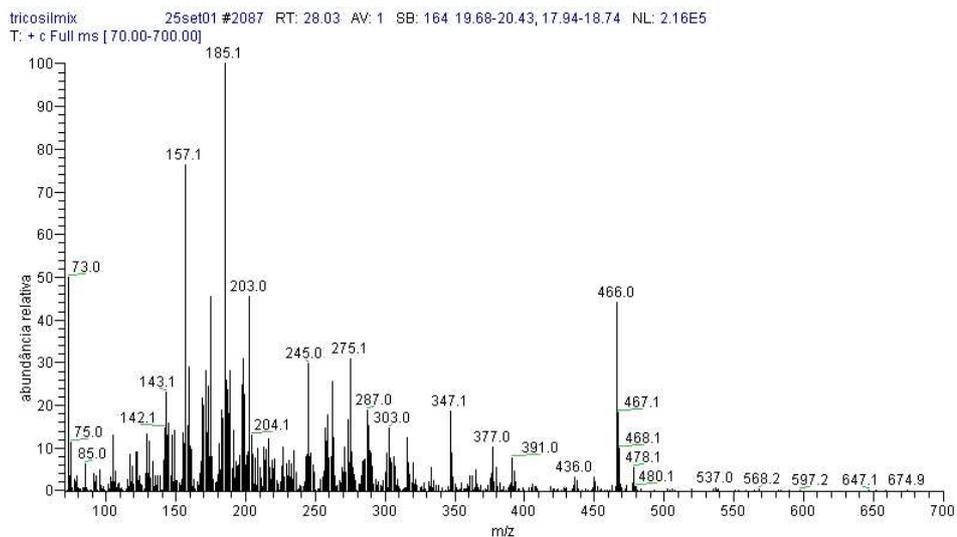


Figura 10 – Espectro de massas de toxina HT-2 sililada (70 eV)

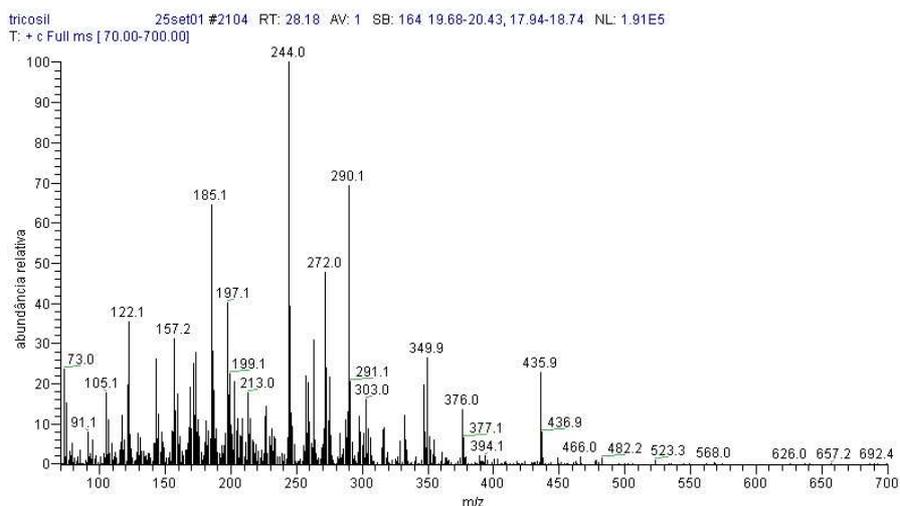


Figura 11 – Espectro de massas de toxina T-2 sililada (70 eV)

1.3. Derivação com anidrido pentafluoropropiônico (PFPA) (fluoroacetilação): o cromatograma da Figura 12 refere-se à derivação com PFPA. Este método gerou cromatograma com muito ruído e linha de base instável. Além disso, a sensibilidade foi pequena, nem sendo possível calcular a recuperação. Neste caso o processo foi descartado. Esta observação coincide com a de MIROCHA et al. (1986) .

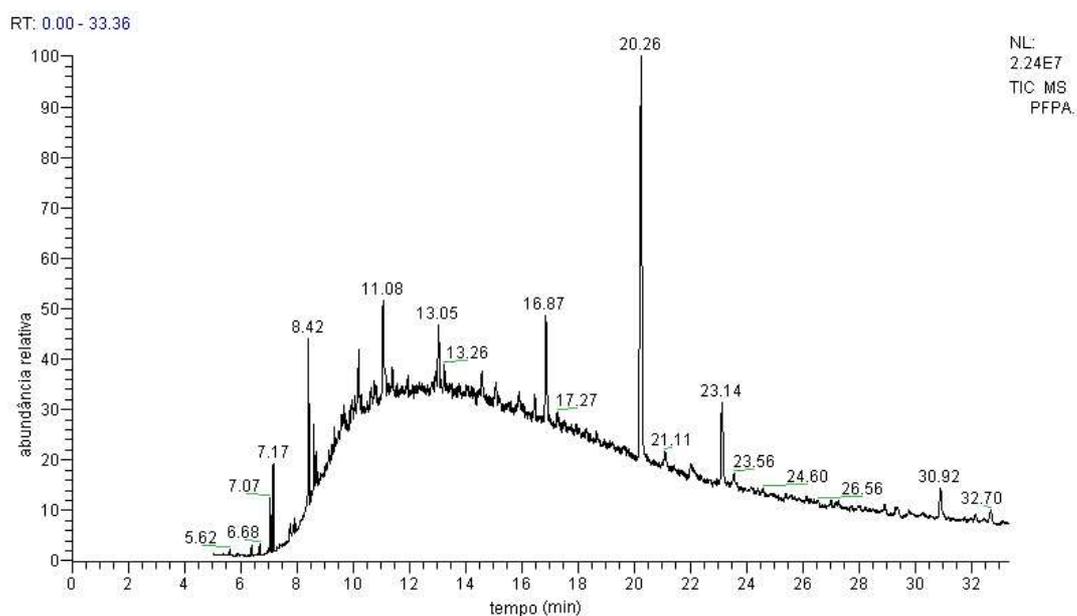


Figura 12 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas dos tricotecenos pentafluoroacetilados utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (Restek Corp.,PA)

1.4. Derivação com anidrido trifluoroacético (TFAA): dois métodos de trifluoroacetilação foram testados: o de ARMSTRONG et al. (1998) e o de SCHWADORF & MULLER (1991) modificado por SCHOLLENBERGER et al. (1998). A trifluoroacetilação de forma geral, gerou cromatogramas mais limpos (Figura 13), com os picos dos tricotecenos melhor resolvidos e com maior sensibilidade do que com a siliilação.

Dentre as reações de acetilação testadas, a trifluoroacetilação de acordo com SCHWADORF & MULLER (1991) e modificada por SCHOLLENBERGER et al. (1998), apresentou melhores resultados, maior estabilidade e também maior sensibilidade, inclusive perante à siliilação. Quando comparada à reação utilizada por ARMSTRONG et al. (1998) verificou-se que ela envolve menos etapas e, portanto, está menos sujeita a perdas na etapa final do que quando se trabalha com volumes menores que 100 μ L. Os tempos de retenção dos tricotecenos trifluoroacetilados de acordo com SCHWADORF & MULLER (1991) e modificado por SCHOLLENBERGER et al. (1998) estão na Tabela 1. As condições da cromatografia foram: injetor a 260 $^{\circ}$ C, coluna: 80 $^{\circ}$ C/0,20 min, até 205 $^{\circ}$ C a 22 $^{\circ}$ C/min, 205 $^{\circ}$ C/0,25 min, até 270 $^{\circ}$ C a 2 $^{\circ}$ C/min.

Com a trifluoroacetilação, todos os tricotecenos apresentaram-se bem resolvidos após a cromatografia (Figura 13). Estes resultados contrariam a opinião expressa por MIROCHA et al. (1986), de que esta técnica seria adequada para tricotecenos do grupo B, inclusive. Os derivados recomendados por estes autores para DON são éteres TMS e ésteres HFB, não recomendando o uso de TFAA, sob a alegação de que este não reage com todos os grupos hidroxila, levando a uma mistura de produtos para cada tricoteceno, o que originaria vários picos no cromatograma em vez de um só.

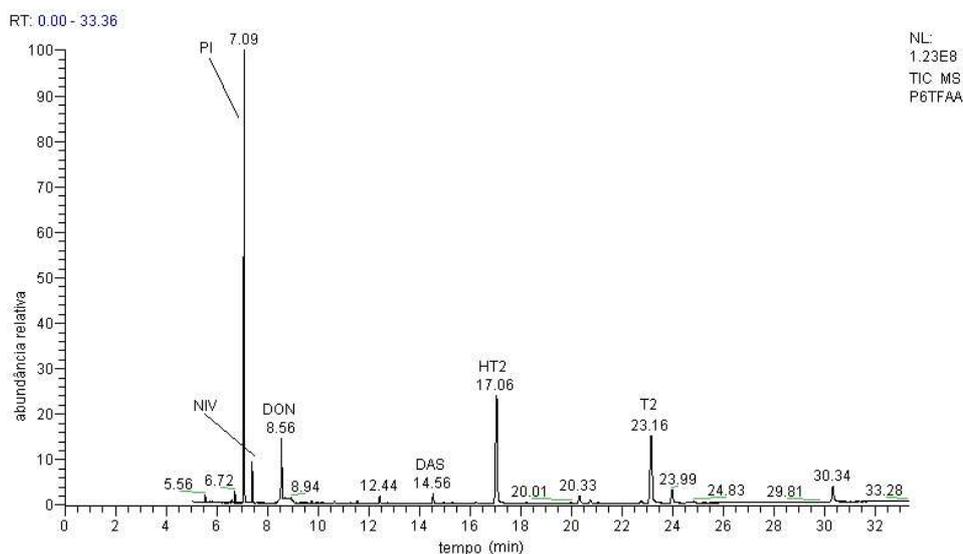


Figura 13 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 4 ng de cada um dos tricotecenos trifluoroacetilados: desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxina T-2 (T2), toxina HT-2 (HT-2) e alfa-cloralose (PI), utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (Restek Corp.,PA)

Os fragmentos obtidos sem derivação apresentaram massas baixas e muitos valores se repetiam nos vários tricotecenos por se tratarem de substâncias semelhantes (Tabela 2). É uma situação provocada pelo processo de fragmentação usado, que é o de impacto de elétrons. ONJI et al. (1998) quantificaram os tricotecenos sem derivação utilizando impacto de elétrons por meio de monitoramento de íon (SIM). Monitoraram os seguintes íons : 135 e 248 para DON, 278 e 306 para DAS e 180 e 364 para T2. Não testaram HT2 e NIV se degradou em vários picos. Obtiveram limites de quantificação da ordem de 100 a 500 ng/g em cevada. Quanto aos fragmentos que estes autores escolheram e os encontrados neste trabalho, pode-se observar que eles conseguiram trabalhar com fragmentos de massa mais elevados. Porém, alguns deles não foram

constatados nos espectros obtidos nas condições do presente estudo, como por exemplo, o 306 para DAS e o 364 para T2. Com a sililação foram obtidos fragmentos de massas maiores, o que tornou mais fácil o processo de identificação dos compostos. A derivação aumenta a massa molecular dos compostos, permitindo que se quebrem em fragmentos de massas maiores. Esta é uma vantagem, porque quanto maior o número de fragmentos de uma molécula, mais difícil será observá-la e detectá-la principalmente quando em um alimento.

Tabela 2 – Massas características dos tricotecenos de acordo com a derivação realizada

TRICOTECENOS	FRAGMENTOS (m/z) MAIS CARACTERÍSTICOS		
	(sem derivação)	(com sililação)	(com fluoracetilação)
Desoxinivalenol	91, 107, 135, 175, 203, 231,	73, 207, 235, 259, 333, 393, 422, 512	117, 145, 194, 205, 231, 259, 373, 470,
Nivalenol	77, 91, 159, 177, 205, 253, 312	73, 191, 231, 261, 289, 349, 379,	194, 229, 257, 359, 371, 485, 696
Diacetoxiscirpenol	77, 91, 124, 137, 159, 215, 233,	73, 124, 159, 197, 244, 272, 290,	91, 105, 124, 201, 229, 296, 359, 329,
Toxina T-2	57, 77, 91, 121, 138, 157, 172,	73, 122, 185, 244, 272, 290, 350, 436	121, 138, 180, 205, 227, 327, 401, 418,
Toxina HT-2	77, 91, 115, 141, 159, 203, 204,	73, 157, 185, 203, 245, 275, 347, 466	121, 138, 180, 205, 341, 455, 472

Os derivados-trifluoroacetilados (-TFA) foram otimizados com a introdução de receptores de ácidos. De acordo com SCHWADORF & MULLER (1991), os anidridos fluoroacéticos reagem prontamente com os grupo álcoois dos tricotecenos produzindo derivados voláteis estáveis por três dias sob refrigeração, porém KOTAL et al. (1999) observaram que os derivados TFA permaneceram estáveis por uma semana em temperatura ambiente. Os tricotecenos podem ser diretamente acetilados com um anidrido, em conjunto com uma base, como por exemplo bicarbonato de sódio, neste caso servindo como receptor de ácido e

aumentando a reatividade e rendimento dos derivados (SCHWADORF & MULLER,1991). Usando anidrido, o meio fica ácido, podendo-se levar à decomposição de compostos a eles sensíveis. Por este motivo os métodos incluem bases ou compostos com grupamentos básicos como o trifluoroacetilimidazol (TFAI) e o n-metil-bis[trifluoroacetamida] (MBTFA), que liberam imidazol e acetamida, respectivamente, os quais são grupamentos básicos. Em paralelo, é necessário eliminar o excesso de reagentes devido à sua grande reatividade química. Caso esta providência não seja tomada, efeitos adversos podem aparecer na análise subsequente, como por exemplo, a possibilidade de decomposição dos compostos derivados devido à presença de resíduo dos compostos reativos no injetor do cromatógrafo (KIENTZ & VERWEIJ, 1986; MATEO et al., 2001). Neste caso, o uso de anidridos ácidos voláteis parece ser o mais adequado. Este sistema é considerado simples e barato, porém, os derivados produzidos não são tão estáveis como os sililados (LANGSETH & RUNDBERGET, 1998).

De acordo com FURLONG (1992) dentre os critérios para escolha de um tipo de derivação estão a facilidade de emprego, que a derivação se complete e a volatilidade do derivado seja relativamente alta, além do grau de melhoria das qualidades cromatográficas.

De forma geral, a determinação de tricotecenos sem derivação produz fragmentos menores do que qualquer uma das derivações testadas e, portanto, este processo está mais sujeito às interferências de contaminantes e ao efeito matriz. Estes fragmentos são pouco confiáveis para identificação e podem ser ocultados numa quantificação. Usualmente os fragmentos de massa maiores são mais característicos.

As Figuras 14 a 18 mostram os espectros de massas dos tricotecenos trifluoroacetilados.

P6TFAA05fev02b_020205120555 #332 RT: 8.57 AV: 1 NL: 1.85E6
T: + c Full ms [70.00-750.00]

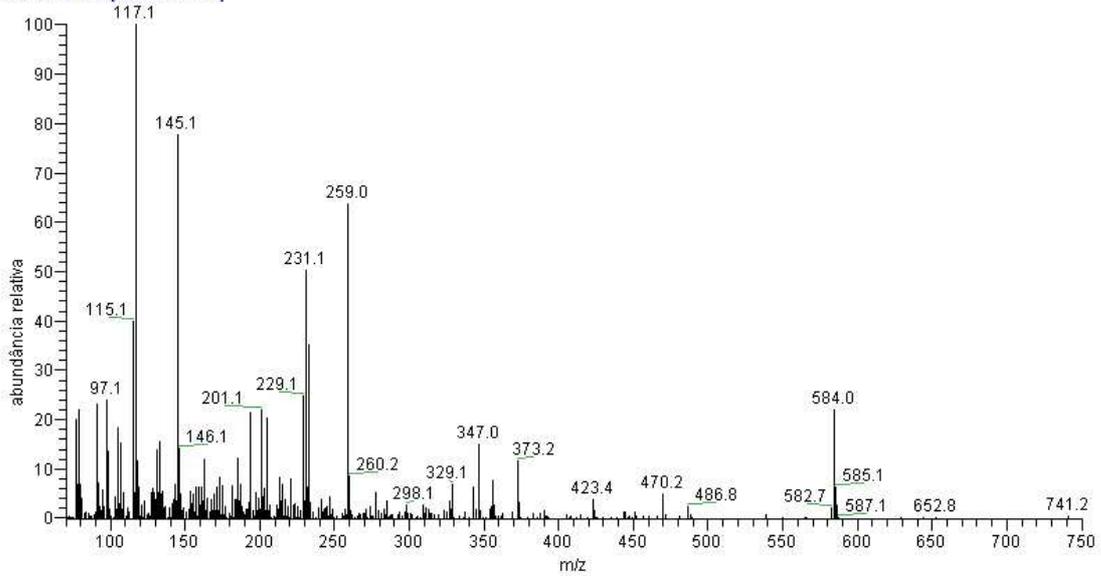


Figura 14 – Espectro de massas de desoxinivalenol trifluoroacetilado (impacto de elétrons 70 eV)

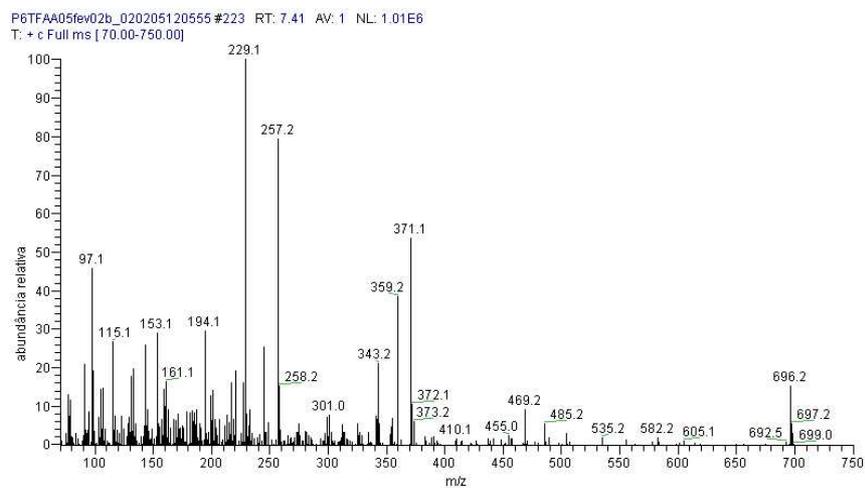


Figura 15 – Espectro de massas de nivalenol trifluoroacetilado (impacto de elétrons 70 eV)

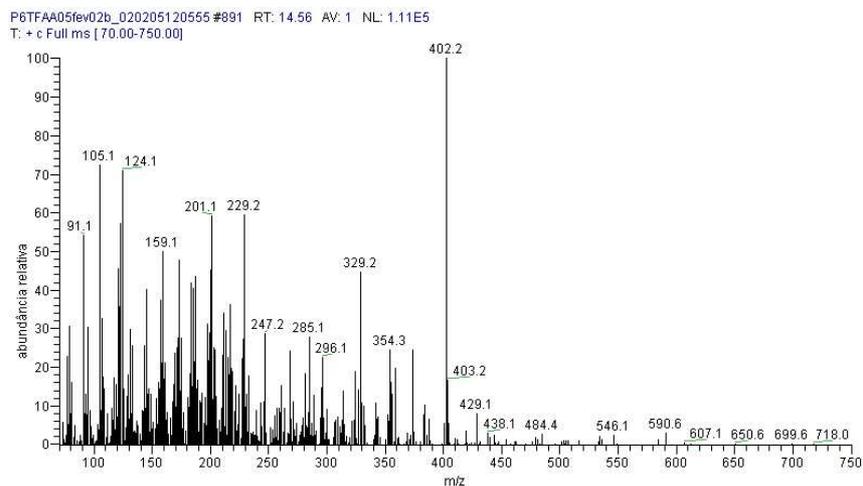


Figura 16 – Espectro de massas de diacetoxiscirpenol trifluoroacetilado (impacto de elétrons 70 eV)

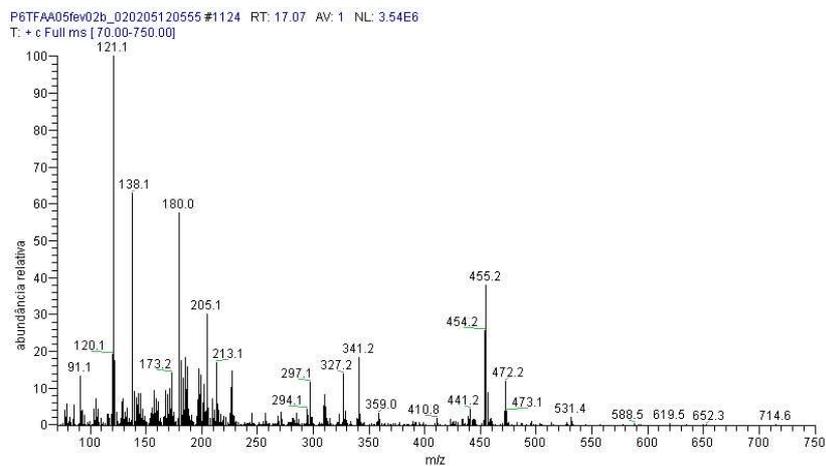


Figura 17 – Espectro de massas de toxina HT-2 trifluoroacetilada (impacto de elétrons 70 eV)

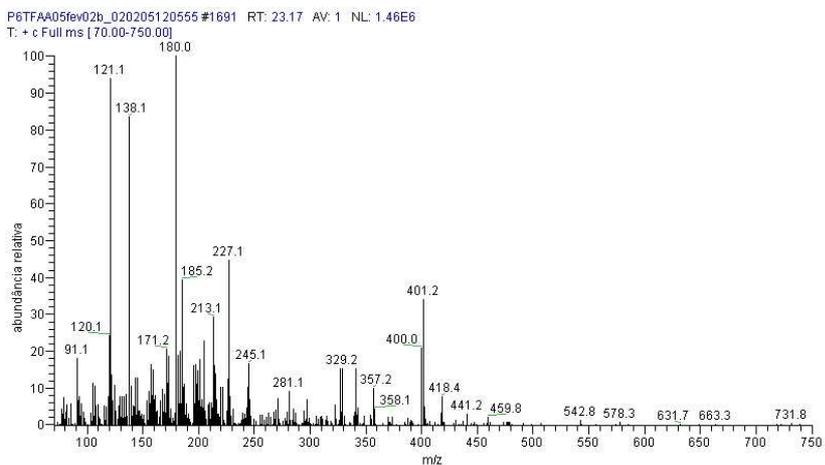


Figura 18 – Espectro de massas de toxina T-2 trifluoroacetilada (impacto de elétrons 70 eV)

A silição traz uma vantagem que é a maior estabilidade dos derivados, que podem ser estocados pelo menos durante dez dias a -18°C (LANGSETH & RUNDBERGET, 1998). Porém, há desvantagens como o excesso de reagente pode danificar a coluna e podem aparecer picos duplos no cromatograma (derivação incompleta).

A trifluoroacetilação trouxe derivados cujos fragmentos apresentaram melhores relações sinal/ruído. E pelos cromatogramas obtidos observou-se que nesta derivação todos os tricotecenos estão bem resolvidos.

Outro parâmetro avaliado foi a sensibilidade (**s**). Como o detector utilizado responde a massa, definiu-se **s** como a área do pico cromatográfico integrado/ massa do analito que passa pelo detector (IUPAC, 1993). O equipamento utilizado mede a área do pico integrado na unidade *count* por segundos (C.s) e massa do analito em ng foi usada nestes cálculos. Desta forma observou-se que o detector apresentava maior sensibilidade para os derivados trifluoroacetilados do que para os derivados sililados (Tabela 3). A sensibilidade para DON trifluoroacetilado é cerca de 1,7 e para NIV trifluoroacetilado e T2 trifluoroacetilada praticamente o dobro do que seus derivados sililados. Para HT2, a sensibilidade foi quase que cinco vezes maior e para DAS trifluoroacetilado a sensibilidade foi praticamente semelhante aos derivados sililados.

Tabela 3 – Sensibilidade (relação área integrada / massa) para cada um dos tricotecenos derivados por silição e trifluoroacetilação

TRICOTECENOS	SENSIBILIDADE (C.s/ ng) *	
	derivados sililados **	derivados trifluoroacetilados **
Desoxinivalenol	1,06 x 10⁶	1,77 x 10⁶
Nivalenol	0,44 x 10⁶	0,92 x 10⁶
Diacetoxiscirpenol	0,17 x 10⁶	0,19 x 10⁶
Toxina HT-2	0,29 x 10⁶	1,39 x 10⁶
Toxina T-2	0,43 x 10⁶	0,93 x 10⁶

NOTA: * cálculo baseado na concentração de padrões 6 ng/μL; ** valores médios:
C.s = *count* por segundos; ng = nanogramas

2. Escolha do melhor padrão interno

A introdução do padrão interno teve principalmente o objetivo de corrigir o volume das injeções, uma vez que não se dispunha de injetor automático. Foram testadas duas substâncias para uso como padrão interno (PI). Primeiramente testou-se o éster metílico do ácido araquídico que havia sido utilizado por FURLONG & SOARES (1995) e OLIVEIRA (2001). Testou-se também o alfa-cloralose, recomendado por Michele Solfrizzo (comunicação pessoal) e também utilizado em alguns trabalhos (LANGSETH & RUNDBERGET, 1998; SCHOTHORST & JEKEL, 2001).

O éster metílico do ácido araquídico que não é derivado como os tricotecnos estudados, é simplesmente adicionado no extrato final com o intuito de controlar distorções do volume de injeção. Notou-se que ele cumpriu sua função com quatro dos tricotecnos, porém seu tempo de retenção coincidia exatamente com o de DON.

O alfa-cloralose funcionou para todas as derivações testadas com pequenos ajustes na programação da coluna, desta vez também controlando a etapa de derivação. SCHOTHORST & JEKEL (2001) usaram esta substância como padrão interno e a submetem a silição. LANGSETH & RUNDBERGET (1998) já haviam verificado que esta substância preenchia todos os requisitos de um padrão interno tanto para derivados siliados como para os pentafluoroacetilados e provavelmente funcionaria para os heptafluoroacetilados. Neste estudo verificou-se que também pode ser usado para os trifluoroacetilados. O composto possui um grupo glucofuranose que é bastante polar e pode inclusive ser utilizado para controlar a etapa de limpeza quando se emprega coluna de carvão, alumina e Celite ou a MycoSep.

O fato desta substância poder ser submetida a uma reação de derivação, possibilitando controlar esta etapa, bem como diminuir as variações do processo de injeção no cromatógrafo foi determinante na sua escolha como padrão interno.

Alguns estudos adicionam PI aos extratos apenas com o intuito de corrigir problemas na derivação, como ESKOLA et al. (2001). Note-se que nem sempre o padrão interno é desejável. SCHWADORF & MULLER (1991) verificaram que o padrão interno, no caso DDT, não melhorou os resultados significativamente obtidos por estes autores que possuíam um auto amostrador.

A programação de temperatura foi otimizada com a introdução do padrão interno. Os tempos de retenção médios obtidos na cromatografia de tricotecnos derivados após introdução do padrão interno (PI) foram: alfa-cloralose: 13,70 min; DON: 15,57 min; DAS: 18,37 min; NIV: 19,15 min; HT-2: 28,03 min; T-2: 28,18 min, para a sililação, segundo a programação: injetor em 260°C, coluna inicialmente em 80°C/0,20 min, até 205°C a 18°C/min, 205°C/0,25 min, de 205°C até 270°C a 2°C/min. E para a trifluoroacetilação segundo SCHWADORF & MÜLLER (1991) modificado, foram: alfa-cloralose: 7,17 min; DON: 8,69 min; NIV: 7,49 min; DAS: 14,15; HT2: 17,35 min e para T2 23,48 min, segundo a programação: injetor em 260°C, coluna inicialmente em 80°C/0,20 min, até 205°C a 22°C/min, 205°C/0,25 min, de 205°C até 270°C a 2°C/min.

Os fragmentos de massas mais característicos do alfa-cloralose sililado e trifluoroacetilado estão na Tabela 4.

Tabela 4 - Fragmentos mais característicos do alfa-cloralose derivado

	FRAGMENTOS m/z MAIS CARACTERÍSTICOS	
	com sililação	com fluoracetilação
alfa-cloralose (PI)	73, 147,191,205, 217, 245,	81, 109, 223, 251,319, 479

As Figuras 19 e 20 trazem os espectros de massas de alfa-cloralose sililada e trifluoroacetilada, respectivamente.

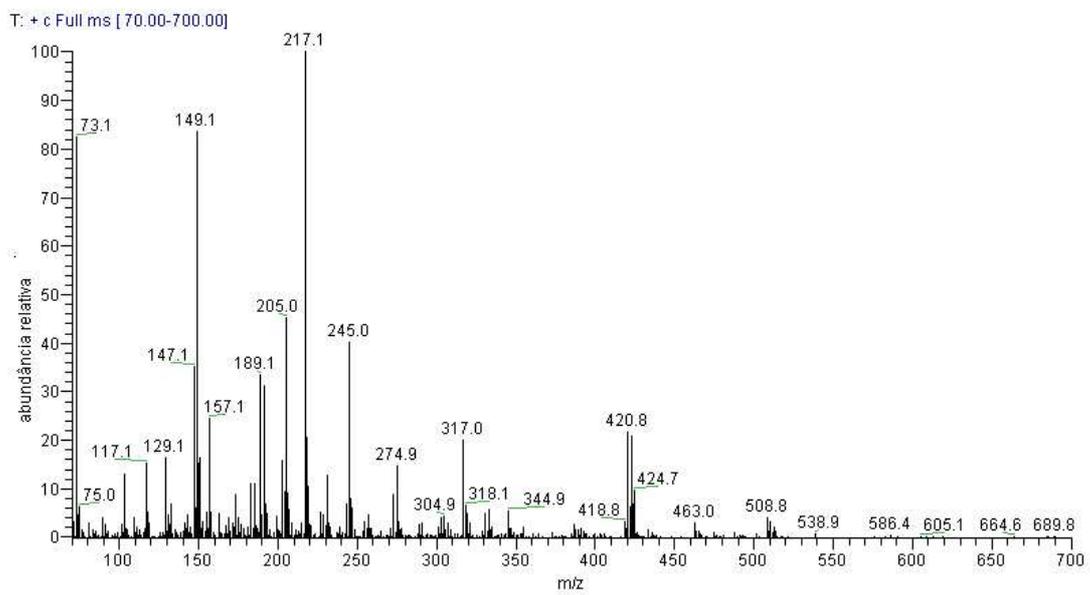


Figura 19 – Espectro de massas de alfa-cloralose sililada (impacto de elétrons 70 eV)

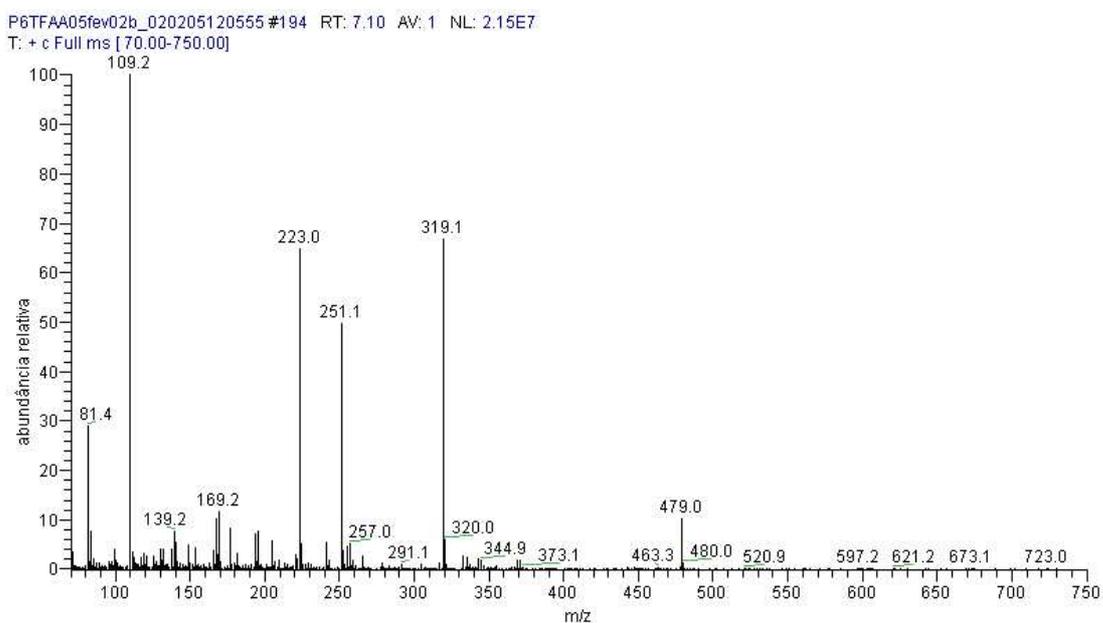


Figura 20 – Espectro de massas de alfa-cloralose trifluoroacetilada (impacto de elétrons 70 eV)

3. Confirmação dos resultados

Em um cromatógrafo gasoso com sistema de detecção por espectrometria de massas (CG-EM) a forma de ionização afetará as características dos espectros gerados. Neste caso é o impacto de elétrons (energia medida em eV) que determina o padrão de fragmentação. O que a princípio leva a crer que espectros idênticos podem ser obtidos em diferentes equipamentos CG-EM, desde que a energia dos elétrons seja a mesma. Isto levou à compilação dos dados dos espectros obtidos em 70 eV para a geração de bibliotecas disponíveis nos instrumentos. No entanto, no decorrer deste trabalho, verificou-se diferenças dos

espectros aqui obtidos com aqueles gerados por equipamentos quadrupolo. A forma de calibração dos equipamentos tipo *íon trap* é distinta dos quadrupolo e isto pode ter levado a obter espectros com os mesmos fragmentos porém com diferentes abundâncias relativas. Esta mesma observação foi relatada na revisão de HENRY (1999). Diferenças nas intensidades dos picos de espectros de *íon trap* e de bibliotecas como NIST e Wiley podem tornar difícil a identificação. Desta maneira os espectros obtidos neste trabalho foram comparados com os espectros obtidos por ARMSTRONG et al. (1998), pois ambos equipamentos utilizados são tipo *íon-trap*. Os espectros de impacto de elétrons foram idênticos, ou seja, os fragmentos das massas e as abundâncias relativas são os mesmos. Já os fragmentos das massas indicados tanto por SCHWADORF & MULLER (1991) como por SCHOLLENBERGER et al. (1998), que utilizaram equipamento tipo *íon trap* porém com ionização química, foram bem maiores. A maioria destes fragmentos nem aparece nos cromatogramas aqui obtidos. Também serviu de material de consulta os espectros que constam no capítulo escrito por MIROCHA et al. (1986) apesar de não apresentar os espectros de DON-TFA e NIV-TFA, pois acreditava-se que naquela ocasião DON e NIV não eram derivados quantitativamente por TFAA.

Para confirmação ainda se discute quantas razões de íons corretas são necessárias para identificação positiva, mas geralmente três íons são considerados suficiente para um espectro de impacto de elétrons (PLATTNER et al., 1989; WEBB & SARGENT, 2000).

A identidade dos tricotecenos foi determinada comparando-se tempos de retenção, espectros de massas e razão das intensidades de vários fragmentos de massas com os dos padrões.

Na Tabela 5 estão os fragmentos de massas selecionados para detecção e quantificação dos tricotecenos derivados tanto por sililação quanto por fluoroacetilação.

Tabela 5 - Fragmentos m/z derivados mais usuais selecionados para quantificação

						Referências
Alfa-cloralose (PI)						
sililação	73	191	205	217	245	
fluoroacetilação	81	109	223	251	319	
Desoxinivalenol						
sililação	73	235	393	422	512	A
fluoroacetilação	117	145	231	259	584 *	B
Nivalenol						
sililação	73	191	261	289	510	A
fluoroacetilação	229	257	359	371	696*	B
Diacetoxiscirpenol						
sililação	73	244	290	350	378	A
fluoroacetilação	91	124	229	329	402	B
Toxina HT-2						
sililação	73	185	157	203	466	A
fluoroacetilação	121	138	180	341	455	B
Toxina T-2						
sililação	73	185	244	290	350	A
fluoroacetilação	121	138	180	227	327	B
					401	

* íon molecular

PI = padrão interno

A = MIROCHA et al. 1986

B = MCLACHLAN et al.1992

O fragmento mais abundante seria a primeira escolha, em seguida o íon molecular. Na escolha dos íons foi sempre verificada a reprodução da intensidade do sinal de injeção para injeção e verificada a estabilidade da relação sinal/ruído. Não são selecionados íons com abundância menor que 10%, pois o programa de integração dos dados pode confundir-lo com o ruído e não achar o pico.

Para a quantificação, foram utilizados de cinco a seis fragmentos para cada tricoteceno, conforme a Tabela 5, a fim de se diminuir oscilações observadas, provavelmente originárias da própria estrutura do equipamento de *íon trap* (armadilha de íons). E desta forma pode-se ter:

- maior seletividade: a escolha de fragmentos específicos diminui ou elimina o efeito matriz, como mostra a Figura 21;
- maior sensibilidade: com mais fragmentos, tem-se mais massa e a sensibilidade aumenta;
- reprodutibilidade : pois a oscilação de um fragmento compensa a do outro.

A reconstrução do cromatograma utilizando estes íons escolhidos (RIC) está representada na Figura 21, referente a uma amostra de canjica não contaminada, exemplificando como diminui o número de picos interferentes.

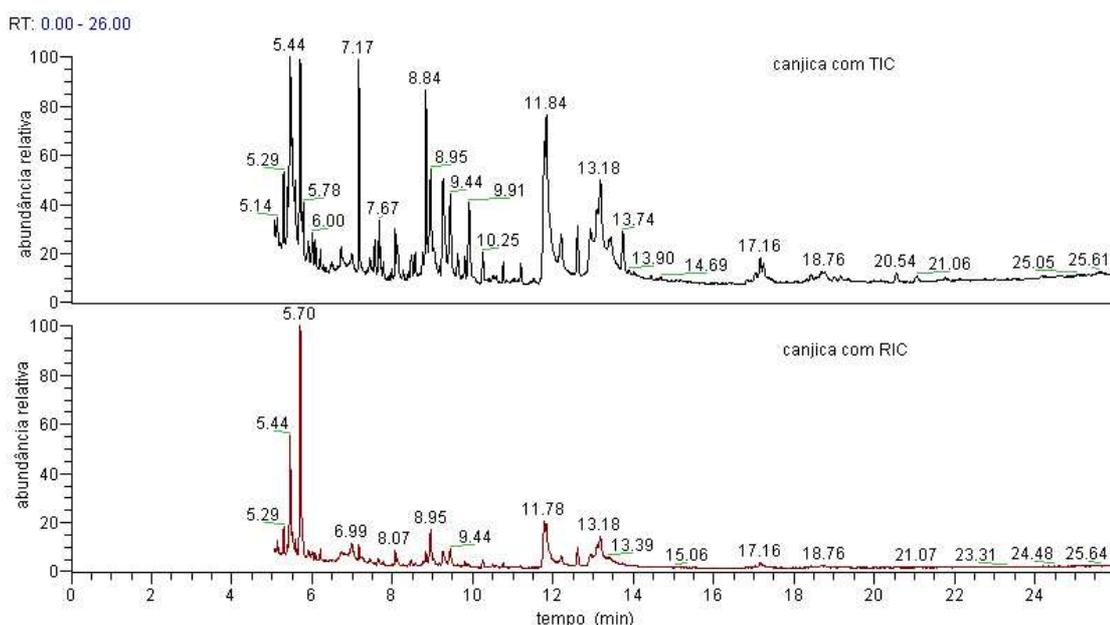


Figura 21 – Cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de canjica não contaminada, extraída e limpa por método usando coluna MycoSep 225, submetida à derivação com TFAA, sendo o cromatograma superior obtido com os íons totais (TIC) e o inferior com reconstrução dos íons (RIC múltiplo)

Na Tabela 6 estão relacionados os fragmentos utilizados para confirmação da identidade dos tricotecenos trifluoroacetilados e suas respectivas razões de intensidade. Além disso, é importante notar a presença dos íons moleculares de DON e NIV, 584 e 696, respectivamente (Tabela 5), os únicos a aparecerem nos espectros de impacto de elétrons deste estudo.

Tabela 6 – Tricotecenos trifluoroacetilados fragmentados no modo impacto de elétrons (70 eV) usados para a etapa de confirmação

TRICOTECENO	TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)	FRAGMENTOS DE MASSA (U.M.A.)	RAZÃO DAS INTENSIDADES
Nivalenol	7,49	229	2
		257	1
		359	1-2
Desoxinivalenol	8,69	145	3
		259	2-4
		373	1
Diacetoxiscirpenol	14,15	229	1
		329	1
		402	2-3
Toxina HT-2	17,35	121	5-7
		341	1
		455	2-3
Toxina T-2	23,48	180	3-5
		227	1-2
		327	1
		401	1-2

u.m.a. = unidade de massa atômica

4. Avaliação de sistema de extração e limpeza

A extração dos tricotecenos requer solventes ou mistura de solventes polares, sendo que os mais utilizados são acetonitrila e metanol. Foram avaliadas duas técnicas sendo uma delas com extração com metanol e água (270+30,v/v) e a segunda com acetonitrila e água (84+16, v/v). Quanto à limpeza, a maior parte dos métodos inclui uma etapa de cromatografia de coluna, sendo que atualmente as colunas/cartuchos de extração de fase sólida (EFS) são muito utilizadas. As técnicas de limpeza de extratos foram testadas observando-se a recuperação dos tricotecenos e o aspecto dos cromatogramas (eliminação de ruídos e de interferentes).

4.1. Teste do sistema de extração e limpeza de OLIVEIRA & SOARES (2001) utilizando coluna MycoSep 225

A técnica de extração testada foi a descrita por FURLONG & SOARES (1995) modificada por OLIVEIRA & SOARES (2001) e acrescida da limpeza em coluna MycoSep 225. Foram utilizadas, nestes testes, amostras de produtos de milho como flocos de milho, canjica, fubá, farinha de milho, milho em lata e sêmola. Foram utilizadas duas amostras de cada tipo para os testes.

Não se obteve nenhuma recuperação, de nenhum dos tricotecenos, para farinha de milho, milho em lata e sêmola. A recuperação das toxinas para as amostras de fubá foram para DON, 150%, para DAS, 32%, para HT2, 133%, e para T2, 190%. Para a canjica e flocos de milho, houve recuperação de DON (116% e 83%, respectivamente) e T2 (30% e 84%, respectivamente), todos valores médios de duas análises. Nivalenol não foi recuperado em nenhum grau de nenhuma das amostras. Devido a esta incapacidade de recuperar NIV e DAS

e não obter-se recuperações de DON, HT2 e T2 em todos os tipos de amostras, este sistema de extração com metanol aquoso seguido de limpeza por partição com diclorometano e em coluna MycoSep 225 não foi considerado adequado. Manteve-se então a coluna alterando a mistura de solventes para a extração dos tricotecenos.

4.2. Teste do sistema de extração e limpeza preconizado por Romer Labs com concentração antes de limpeza em coluna MycoSep 225

Nesta etapa testou-se a extração com a mistura de acetonitrila e água, seguida da limpeza usando-se exclusivamente as colunas MycoSep 225, porém com concentração do extrato antes da limpeza na coluna, de forma a aumentar a quantidade de amostra no extrato final, aumentando-se assim a sensibilidade do método. Nestes testes foram empregadas amostras artificialmente contaminadas de canjica, fubá, milho verde em lata, flocos e farinha de milho. As análises foram conduzidas em duplicatas.

Quanto à concentração das amostras antes da limpeza com coluna MycoSep, foram efetuados testes com alíquotas diferentes. Nos primeiros testes foram concentradas alíquotas de 50 mL. Os resultados não foram satisfatórios. Não houve recuperação para NIV e DAS. Para DON, HT2 e T2 as recuperações foram abaixo de 20%. Um forte efeito matriz foi notado como pode ser observado no cromatograma da Figura 22.

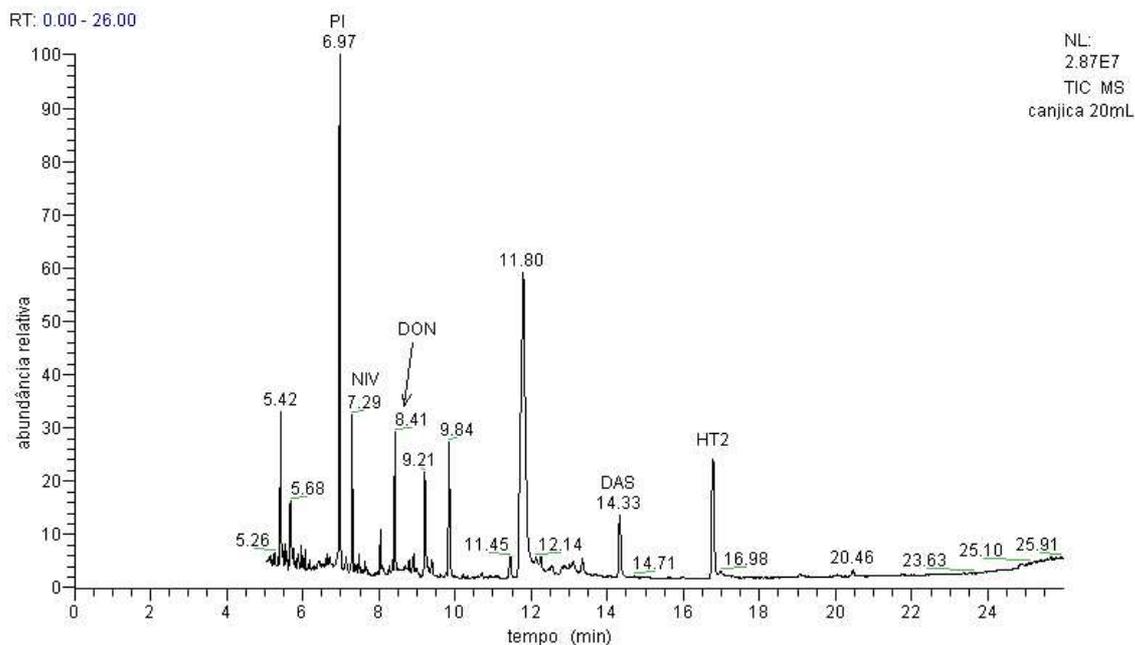


Figura 22 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de canjica contaminada artificialmente com 0,5 µg/g de desoxinivalenol, de nivalenol, diacetoxiscirpenol e toxinas HT-2 e T-2, extraída e limpa por método usando 50 mL do extrato concentrado antes de passagem pela coluna MycoSep 225 e submetida à derivação com TFAA.

Observou-se que concentrando o extrato, a coluna era muito mais exigida para limpeza. Visualmente notava-se que o eluato apresentava cor. As concentrações para 50 mL produziram cromatogramas muito sujos onde não houve nenhuma recuperação.

Mesmo para as outras concentrações, 20 e 30 mL, onde verificou-se recuperação, esta foi especialmente elevada para DAS, HT2 e T2, com médias de 290%, 210% e 304%, respectivamente. O efeito matriz aqui foi decisivo, mesmo usando a reconstituição do cromatograma apenas com os íons característicos das micotoxinas. É provável, que muitos destes íons, por serem oriundos de um

processo de impacto de elétrons que gera fragmentos pequenos, também façam parte da fragmentação dos extratos de amostra. Com isto as concentrações de DAS, HT2 e T2 foram superestimadas.

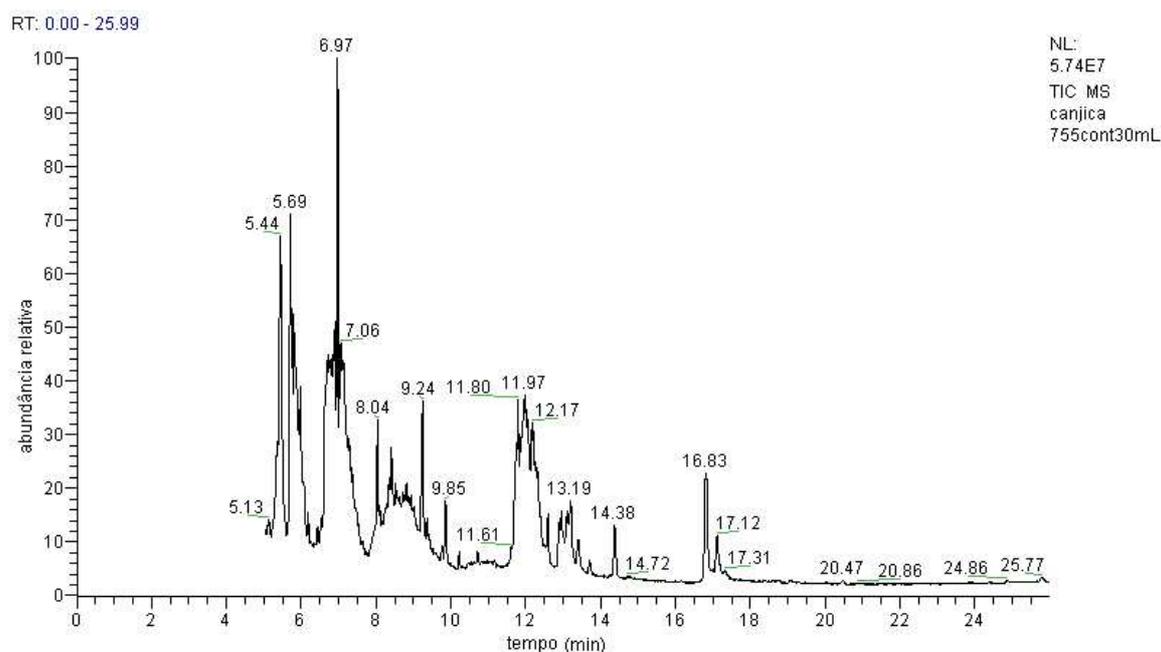


Figura 23 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de canjica com alfa-cloralose (PI) e contaminada artificialmente com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS) e toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2), extraída e limpa por método usando 20 mL do extrato concentrado antes de passagem pela coluna MycoSep 225 e submetida à derivação com TFAA.

Para alíquotas de 30 mL, após concentração, as recuperações variaram para DAS de 200 a 363%, para todas as amostras testadas com exceção do milho em lata que não apresentou nenhuma recuperação. Para HT2 a variação foi de 235-245% e para T2 os valores ficaram na média de 300%. Para DON e NIV, ocorreu o oposto, as recuperações foram baixas, menos de 10%, com exceção da alíquota de 20 mL para amostras de canjica, cujos valores médios de recuperação

para DON, NIV, DAS e HT2 foram 61, 77, 200 e 118%. A recuperação para T2 ficou abaixo de 10%, como observa-se no cromatograma da Figura 23. Estes resultados mostraram que a coluna MycoSep 225 não era apropriada para limpeza de extratos concentrados de nenhuma forma.

4.3. Teste do sistema de extração e limpeza preconizado por Romer Labs usando as colunas MycoSep 225 e 227

O método CG-EM preconizado por Romer Labs para determinação de DON indica uma retirada de 3 mL de alíquota após limpeza pela coluna MycoSep 225. Aqui testou-se a retirada de uma quantidade maior, 4 e 6 mL, e com isso tentar aumentar a sensibilidade do método.

Observou-se que a tomada de mais amostra não implicava exatamente em maior recuperação. Pelo contrário, a recuperação era menor principalmente para as amostras de fubá (Tabela 7).

Analisando os cromatogramas observou-se que as áreas obtidas de amostras de extratos de 4 mL eram muitas vezes maiores das de 6 mL. É provável que para retiradas acima de 4 mL torne-se necessário forçar a passagem de extrato pela coluna e trabalhar no limite do êmbolo, cerca de 6 mL, causando perdas na extração. Presumiu-se que houve saturação da coluna, ou mesmo passagem de amostra sem contato total com a fase estacionária.

As colunas MycoSep 225 foram testadas com amostras de fubá e farinha de milho contaminadas artificialmente com os tricotecenos estudados. Os cromatogramas apresentaram alguns picos interferentes, porém nenhum deles em área que pudesse interferir nos tempos de retenção dos tricotecenos ou mesmo no padrão interno. A primeira técnica de limpeza utilizada foi avaliada quanto à recuperação dos tricotecenos e também quanto à sua capacidade de limpeza dos extratos, produzindo bons cromatogramas, ou seja, com um mínimo de picos

interferentes. Com estes resultados obtidos partiu-se para uma etapa de recuperação dos tricotecenos nestas amostras.

Estas colunas são consideradas formas simples e rápidas de purificação, gerando cromatogramas comparáveis aos dos métodos que usaram várias etapas de limpeza (LANGSETH & RUNDBERGET, 1998). Desta forma, vários autores têm preferido esta forma de limpeza, como KRŠKA (1998) e WETTER et al. (1999). Uma das grandes vantagens de usar este tipo de coluna é a eliminação de várias etapas extras de limpeza, reduzindo-se a chance de perda de amostra e com ganhos em tempo de análise.

Tabela 7 – Recuperação (%) de tricotecenos em amostras de fubá e farinha de milho artificialmente contaminadas, utilizando-se duas alíquotas diferentes de eluatos para concentração anterior à derivação

TRICOTECENO	RETIRADA DE ALÍQUOTA DA COLUNA MycoSep 225			
	4 mL		6 mL	
	fubá	farinha de milho	fubá	farinha de milho
Desoxinivalenol	179,0	102,8	90,8	147,7
Nivalenol	72,7	57,6	46,8	76,0
Diacetoxiscirpenol	96,7	70,8	49,6	99,6
Toxina T-2	272,0	50,5	31,7	70,0
Toxina HT-2	103,0	70,9	55,0	96,6

Os resultados indicam que a alíquota de 4mL é a mais indicada para coluna MycoSep 225. Acima desta quantidade houve a passagem de amostra sem que limpeza fosse efetuada.

Nas amostras de fubá as recuperações ficaram abaixo de 55% para todos os tricotecenos, exceto para DON, quando alíquotas de 6 mL foram usadas. No caso de alíquota de 4 mL as recuperações foram mais altas, porém para T2 foi muito acima do esperado. Nas amostras de farinha de milho as recuperações obtidas com 6 mL foram razoáveis sendo que DON novamente obteve a maior recuperação. E para alíquota de 4mL excetuando-se NIV e T2 as recuperações são aceitáveis.

Na etapa seguinte procedeu-se o método sem nenhuma concentração. Pesou-se 25 g de amostra e extraíu-se com 100 mL de acetonitrila: água (84+16, v/v). Após a agitação retirou-se uma alíquota de cerca de 6-8mL que foi transferida para tubo de vidro. Efetuou-se a limpeza com a coluna MycoSep 225. Do eluato transferiu-se 4 mL para frasco de vidro âmbar sililado. Procedeu-se a derivação com anidrido trifluoroacético e injeção no cromatógrafo.

A capacidade de limpeza dos extratos está demonstrada na Figura 24, onde o cromatograma de amostra de farinha de milho sem contaminação pode ser observado. O cromatograma de amostra de milho artificialmente contaminada com os tricotecenos estudados exemplifica a separação dos tricotecenos (Figura 25). Os cromatogramas apresentaram alguns picos de co-extraídos, porém, nenhum em tempo de retenção que pudesse interferir na detecção e quantificação dos tricotecenos ou do padrão interno.

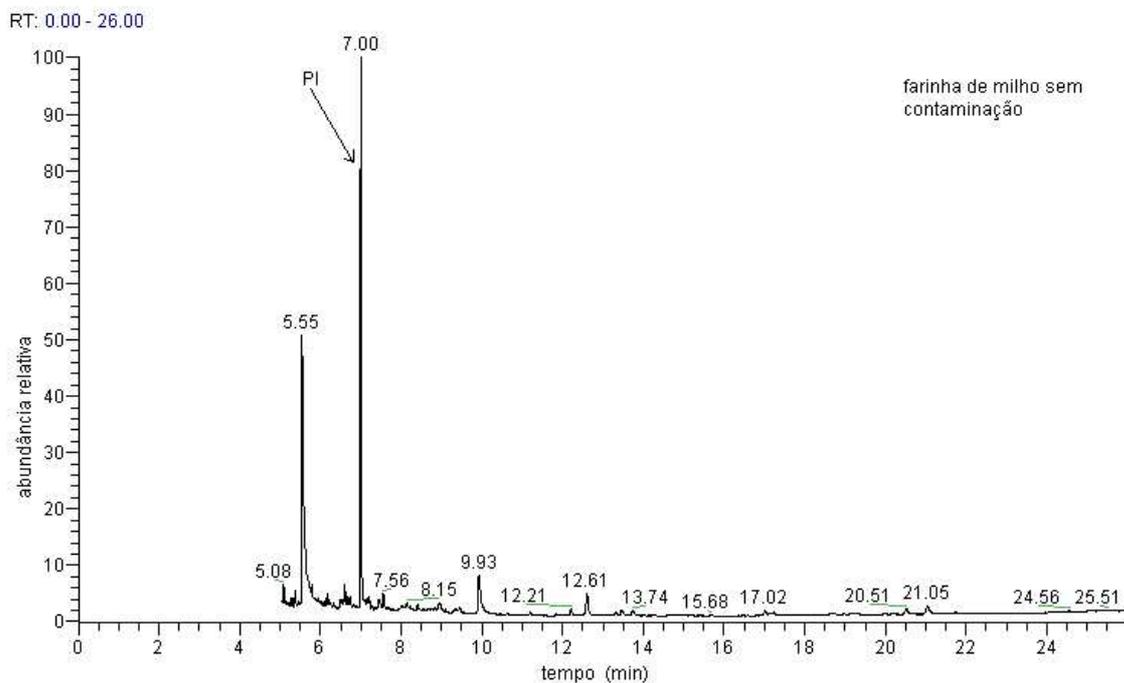


Figura 24 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de farinha de milho sem contaminação, apenas com alfa-cloralose (PI), extraída e limpa por método usando 4 mL do extrato concentrado antes de passagem pela coluna MycoSep 225 e submetida à derivação com TFAA.

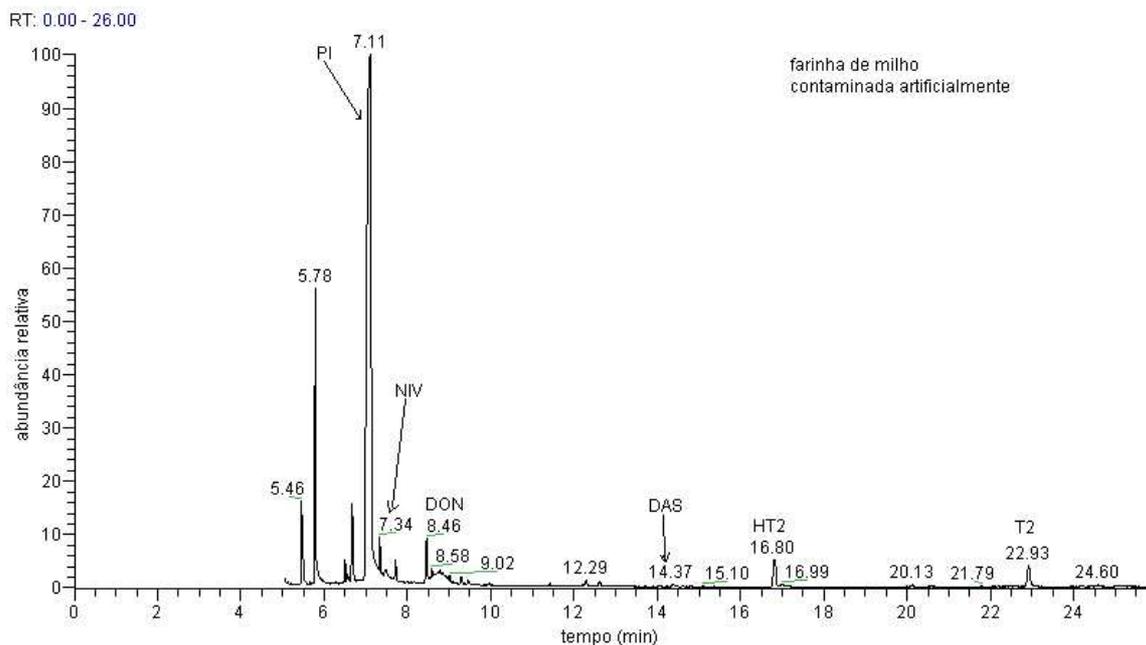


Figura 25 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de farinha de milho com alfa-cloralose (PI) e contaminada artificialmente com 0,5 $\mu\text{g/g}$ de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), de nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS) e toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2). Amostra extraída e limpa por método usando 4 mL do extrato concentrado antes de passagem pela coluna MycoSep 225 e submetida à derivação com TFAA.

Os resultados não foram completamente satisfatórios para todos os produtos de milho, então testou-se a coluna MycoSep 227. A diferença entre elas é a quantidade de recheio, a 227 tem o dobro do material da 225, portanto destinada à amostras mais complexas. E os valores obtidos nestas recuperações estão na Tabela 8. Os testes foram conduzidos com adição de 0,5 $\mu\text{g/g}$ de cada tricoteceno nas amostras, com cinco repetições.

Tabela 8 - Comparação dos valores de recuperação (%) de amostras de milho e produtos enriquecidos com DON, NIV, DAS, HT2 e T2 usando limpeza com colunas MycoSep 225 e 227

AMOSTRAS	RECUPERAÇÃO (%)*					COLUNA
	DON	NIV	DAS	HT2	T2	USADA
Canjica	81,0	Nr	75,0	81,0	108,0	225
Fubá	86,0	64,0	62,8	105,2	103,9	225
Farinha de ...	95,1	68,1	102,6	100,7	118,9	225
Quirera	111,0	80,0	69,0	82,0	106,0	225
Flocos de ...	140,0	84,0	68,0	124,0	108,0	225
Milho em ...	nr	nr	122,0	76,0	124,0	225
Milho em ...	85,4	84,1	109,3	108,4	69,6	225
	86,1	84,6	101,6			

* valores médios de cinco repetições; nr = não recuperado; DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol, T2 = toxina T-2; HT2 = toxina HT-2

As colunas MycoSep destinadas à análise de tricotecenos são uma mistura de carvão ativo, Celite e resina trocadora de íons (LANGSETH & RUNDBERGET, 1998) e têm sido utilizadas em vários estudos (KRSKA, 1998; RADOVÁ et al., 1998; ESKOLA et al., 2001). Em especial, em um estudo colaborativo realizado para determinação de DON em amostras de trigo. A avaliação deste estudo mostrou que os resultados de precisão obtidos, por todos os participantes que empregaram colunas MycoSep para a etapa de limpeza, foram muito bons (SCHUHMACHER et al., 1997).

Observando os dados da Tabela 8, verifica-se que de forma geral os resultados de recuperação obtidos estão dentro de uma faixa aceitável para análise de traços (ppb), de 70 a 120% (HORWITZ et al.,1980). Usando a coluna 227 conseguiu-se recuperar NIV de canjica, o que não havia sido possível antes. Porém, continuou impossível recuperar DON e NIV das amostras de milho em lata, inclusive porque há uma grande região no início do cromatograma totalmente coberta pelos co-extrativos, que encobre não apenas os tricotecenos que possuem os tempos de retenção menores, mas também o PI, neste caso. Para poder calcular a concentração de DAS, HT2 e T2 foi necessário usar calibração externa.

4.4. Teste de sistema de extração e limpeza preconizado por Romer Labs associado à limpeza em coluna MycoSep 227

Os resultados dos testes usando coluna 227 estão na Tabela 9. Uma vez que o resultado foi melhor para algumas amostras e quase que indiferente para as outras, a coluna 227 foi usada para limpeza dos extratos. Foram utilizadas amostras artificialmente contaminadas com 0,5 µg/g de cada tricoteceno e os resultados estão na validação da metodologia, sendo que as recuperações variaram de 83,3 a 105,7 % para DON, 84,6 a 114,5% para NIV, 52,1 a 122,7% para DAS, 71,1 a 92,9 % para T2 e de 81,8 a 155,4 % para HT2.

Nas Figuras 26 a 33, apresentadas a seguir, estão os cromatogramas de íons totais (TIC) para cada uma das amostras estudadas que foram artificialmente contaminadas com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos DON, NIV, DAS, HT2 e T2 e, os cromatogramas dos íons reconstituídos (RIC) também para cada das amostras e para cada um dos tricotecenos. Nestes cromatogramas pode-se observar como o modo RIC evidencia cada um dos tricotecenos, comparado ao modo TIC, e da mesma forma reduz a presença de picos dos interferentes e dos co-extrativos

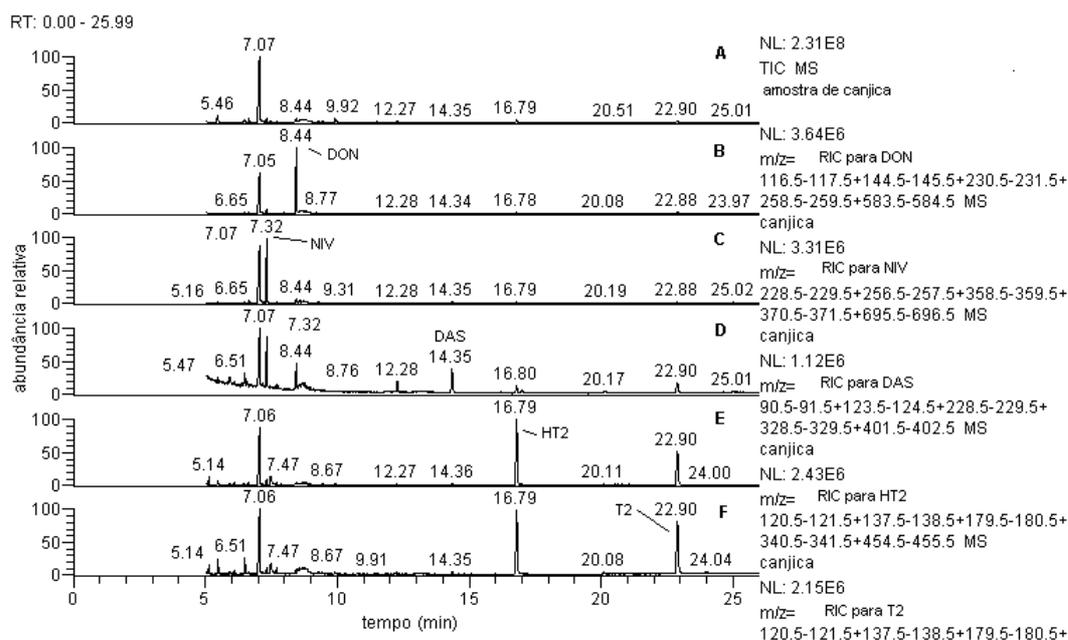


Figura 26 – Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de canjica artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2). Amostra foi limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos (RIC) obtidos a partir do cromatograma TIC (A) para DON, NIV, DAS, HT2 e T2, respectivamente.

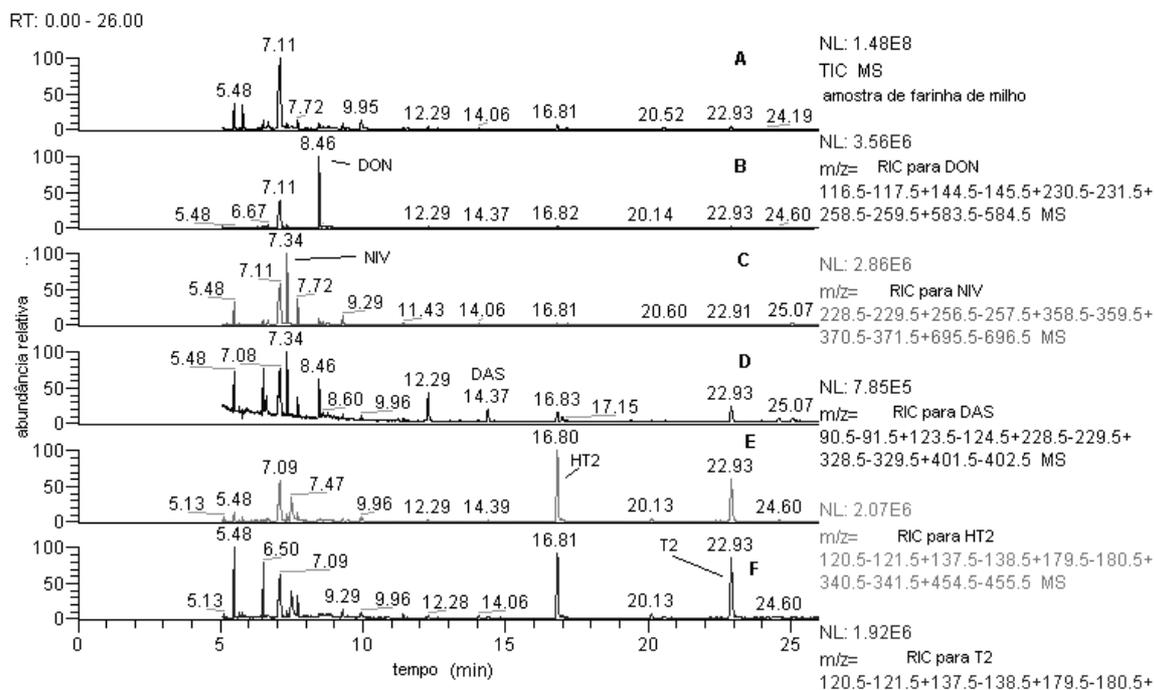


Figura 27 – Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de farinha de milho artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de casa um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2). Amostra foi limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos (RIC) obtidos a partir do cromatograma TIC (A) para DON, NIV, DAS, HT2 e T2, respectivamente.

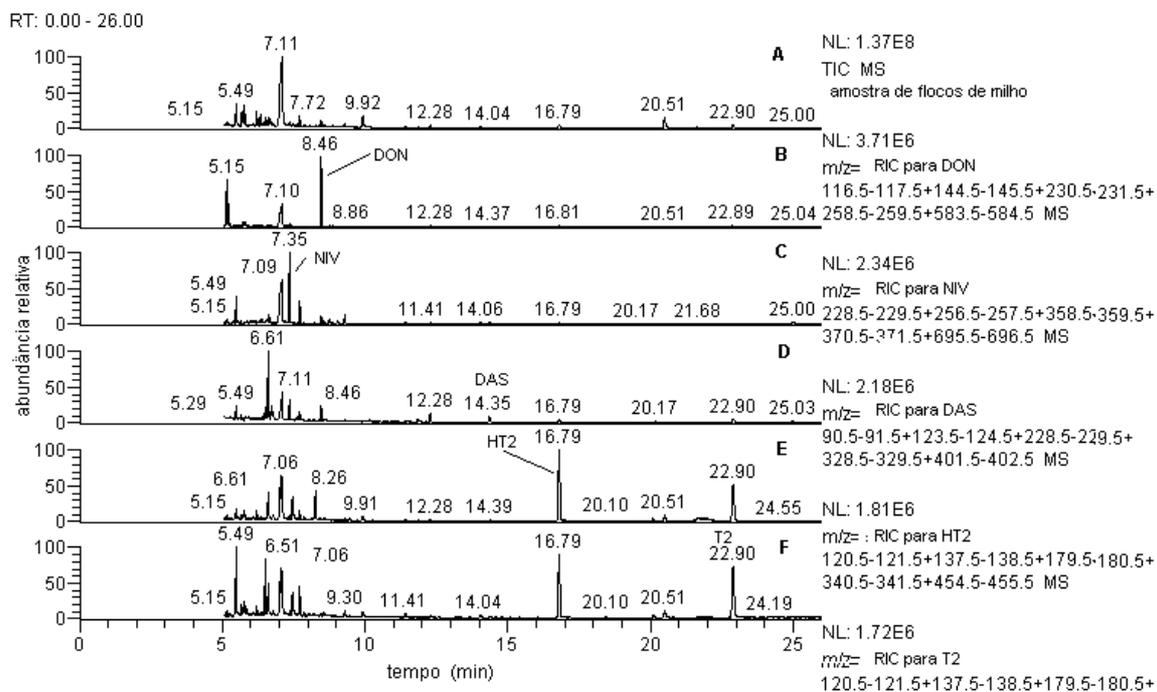


Figura 28 – Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de flocos de milho artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2), limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos (RIC) obtidos a partir do cromatograma TIC (A) para DON, NIV, DAS, HT2 e T2, respectivamente.

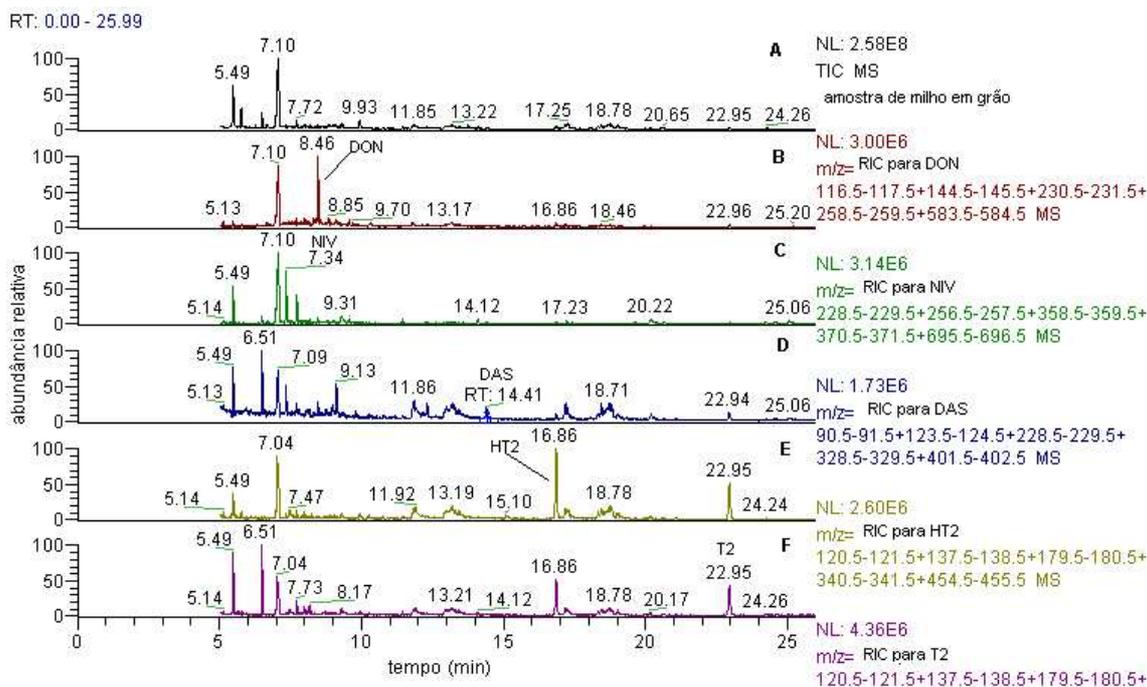


Figura 29 – Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de milho em grão artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2), limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos (RIC) obtidos a partir do cromatograma TIC (A) para DON, NIV, DAS, HT2 e T2, respectivamente.

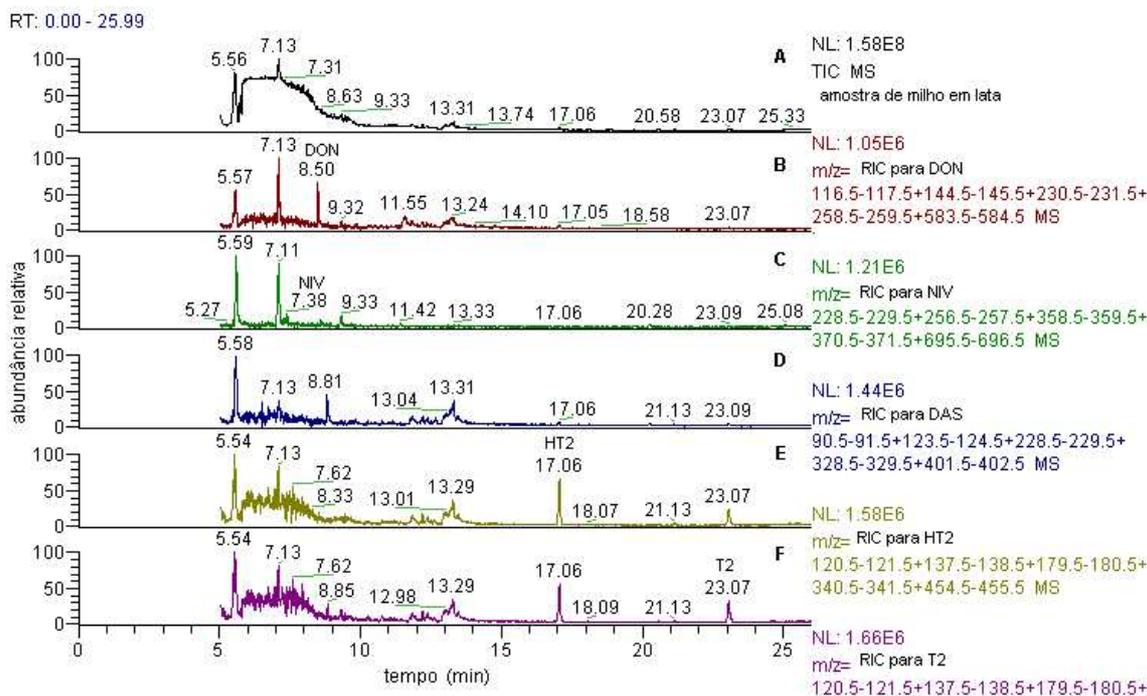


Figura 30 – Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de milho verde em lata artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2), limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos (RIC) obtidos a partir do cromatograma TIC (A) para DON, NIV, DAS, HT2 e T2, respectivamente.

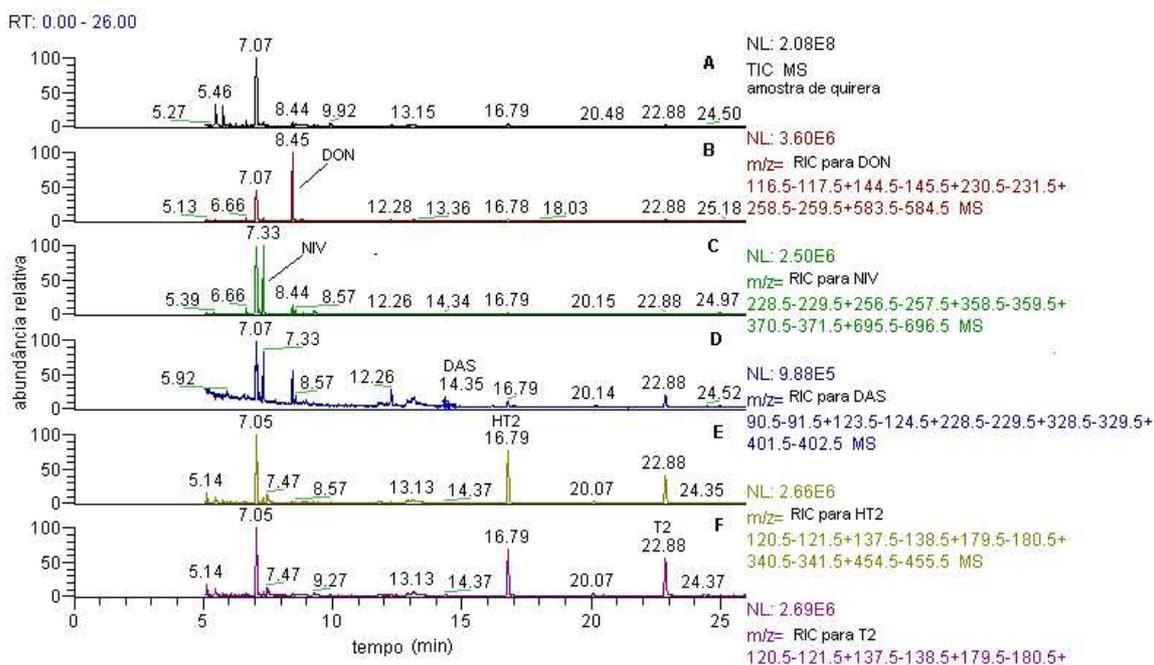


Figura 31 – Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de quirera artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2), limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos (RIC) obtidos a partir do cromatograma TIC (A) para DON, NIV, DAS, HT2 e T2, respectivamente.

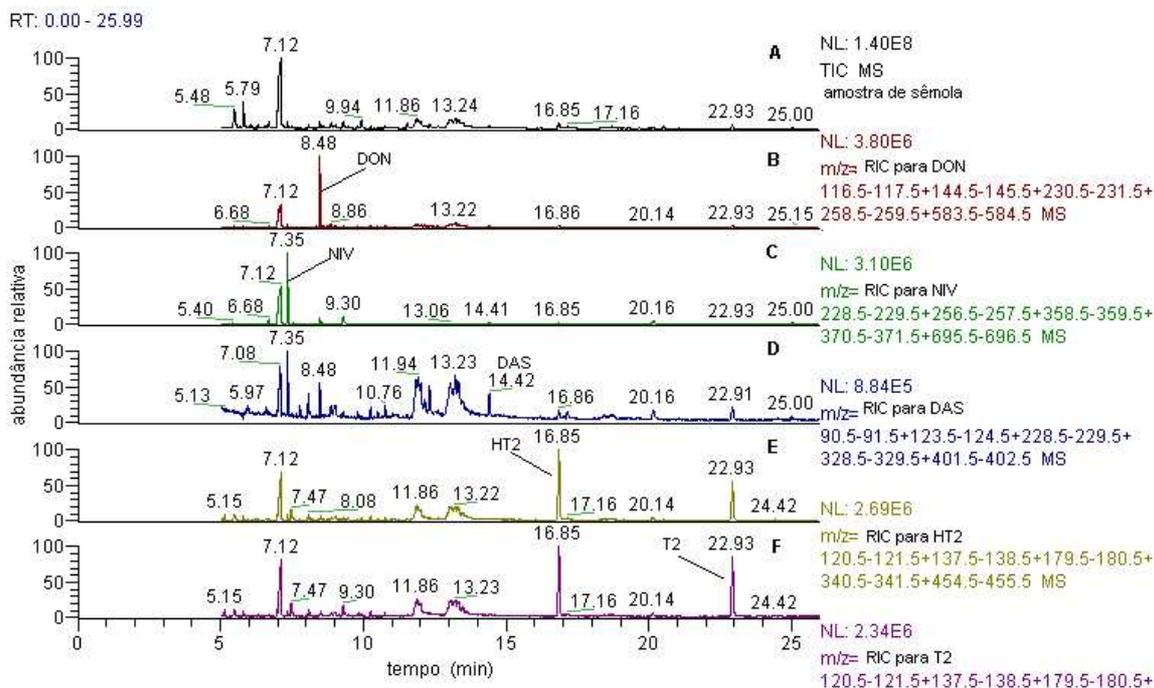


Figura 32 – Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de sêmola artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2), limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos (RIC) obtidos a partir do cromatograma TIC (A) para DON, NIV, DAS, HT2 e T2, respectivamente.

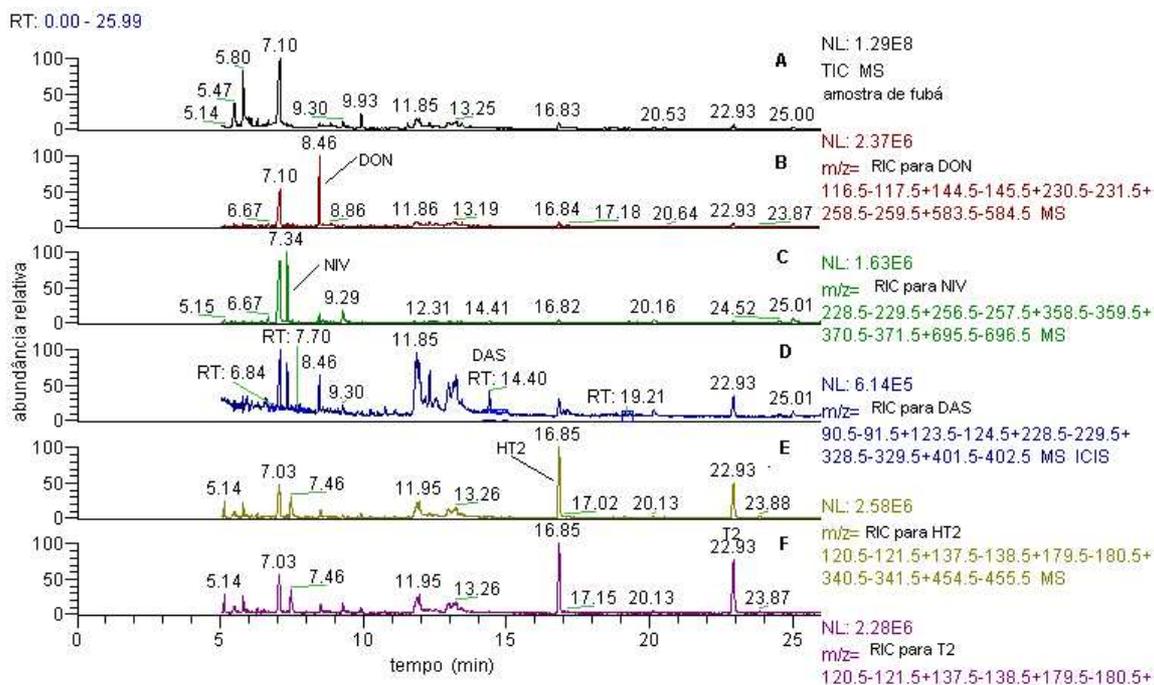


Figura 33 – Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de fubá artificialmente contaminada com 0,5 µg/g de cada um dos tricotecenos, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2), limpa com coluna MycoSep 227, derivada com TFAA (A); (B), (C), (D), (E) e (F) são cromatogramas dos íons reconstituídos (RIC) obtidos a partir do cromatograma TIC (A) para DON, NIV, DAS, HT2 e T2, respectivamente.

5. Recuperação, repetibilidade, e limites de detecção e quantificação

A recuperação e a repetibilidade foram realizadas em cinco repetições para cada tipo de produto de milho. As amostras foram artificialmente contaminadas com 0,5 µg/g de cada tricoteceno, DON, NIV, DAS, HT2 e T2. As amostras contaminadas foram extraídas com acetonitrila + água (84+16,v/v) e seus extratos passaram pelas colunas MycoSep 227. Os extratos limpos foram derivados com TFAA/bicarbonato de sódio. As Tabelas 9 e 10 a seguir mostram os resultados obtidos para milho em grão e produtos de milho, respectivamente.

Tabela 9 – Valores de recuperação para DON, NIV, DAS, HT2 e T2 para amostras de milho em grão

	DON	NIV	DAS	HT2	T2
RECUPERAÇÃO (%)	80,4	84,7	89,7	90,5	72,6
	83,3	86,1	104,3	79,5	71,6
	89,8	85,4	108,3	99,9	67,1
	93,9	84,4	116,3	72,9	77,7
	83,1	82,2	89,5	102,8	66,6
média*	86,1	84,6	101,6	89,1	71,1
DP	5,6	2,5	11,8	12,9	4,5
DPR	6,5	2,9	11,6	14,4	6,4

média* = média de cinco determinações; DP = desvio padrão ; DPR = desvio padrão relativo; DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol; HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2

Tabela 10 – Valores médios de recuperação para DON, NIV, DAS, HT2 e T2 para amostras de produtos de milho

		canjica	flocos de	farinha	fubá	quirera	sêmola	milho
DON	%R média*	105,7	87,2	99,8	113,3	83,3	102,5	nr
NIV	%R média*	99,2	86,7	89,9	112,5	84,8	114,5	nr
DAS	%R média*	122,7	112,3	83,5	69,4	74,2	52,1	116,8
HT2	%R média*	115,9	105,4	155,4	129,2	102,6	140,9	81,8
T2	%R média*	92,9	71,7	95,9	88,4	74,5	83,6	71,1

%Rmédia* = porcentagem de recuperação média de cinco determinações; DP = desvio padrão ; DPR = desvio padrão relativo ; nr = não recuperado; DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol; HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2

Os dados referentes às amostras de milho em lata, os níveis de toxinas HT2, T2 e DAS foram calculados com curva de calibração externa pois a região inicial dos cromatogramas destas amostras apresentaram forte efeito matriz não permitindo que se registrasse as áreas dos padrões internos.

A repetibilidade do método pode ser considerada adequada uma vez que os desvios padrão relativos (DPR) obtidos foram de 4,8 a 18,1 para DON, 3,5 a 13,4 para NIV, 3,8 a 35,7 para DAS, 3,3 a 16,0 para HT2 e de 5,0 a 33,6 para T2.

Quando levamos em consideração que segundo HORWITZ et al. (1980) o CV (=DPR) intralaboratorial esperado para determinações em nível de ppb deve ser de 20-25%, a precisão do método sofreu comprometimento em apenas duas das determinações, DAS em quirera (DPR = 48%) e T2 em milho em lata (DPR= 47%).

Foram traçadas curvas de calibração para cada um dos tricotecenos (Figuras de 34 a 38). As curvas estão em função das áreas relativas (área de cada um dos padrões de tricotecenos/ área do padrão interno) pela concentração dos tricotecenos. Nas Figuras 39 a 43 estão apresentadas as curvas de calibração externa que foram inseridas pois foram utilizadas nas amostras em que os co-extrativos se concentraram no início do cromatograma, impedindo desta forma a visualização do PI, como no caso do milho em lata. Segundo os procedimentos estatísticos descritos por CAULCUTT & BODY (1983) foram calculadas as retas ideais, as melhores retas passando pelo ponto zero. As curvas com PI de DON e NIV foram lineares de 0,8 a 10,0 ng/μL, para DAS de 0,8 a 6,0 ng/μL, de 0,8 a 20,0 ng/μL para toxina T2 e de 0,8 a 35,0 ng/μL para toxina HT2. No caso das curvas sem PI, para DON, DAS, HT2 e T2, estas foram lineares de 0,8 a 10,0 ng/μL e para NIV de 0,8 a 8,0 ng/μL.

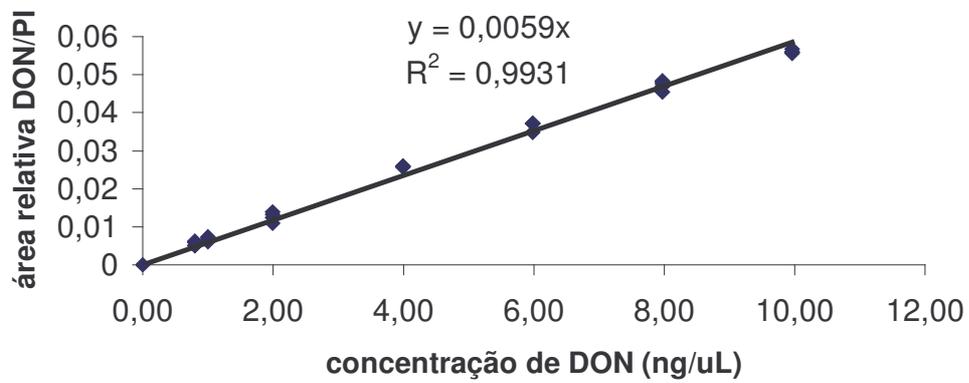


Figura 34- Curva de calibração interna de desoxinivalenol (DON)

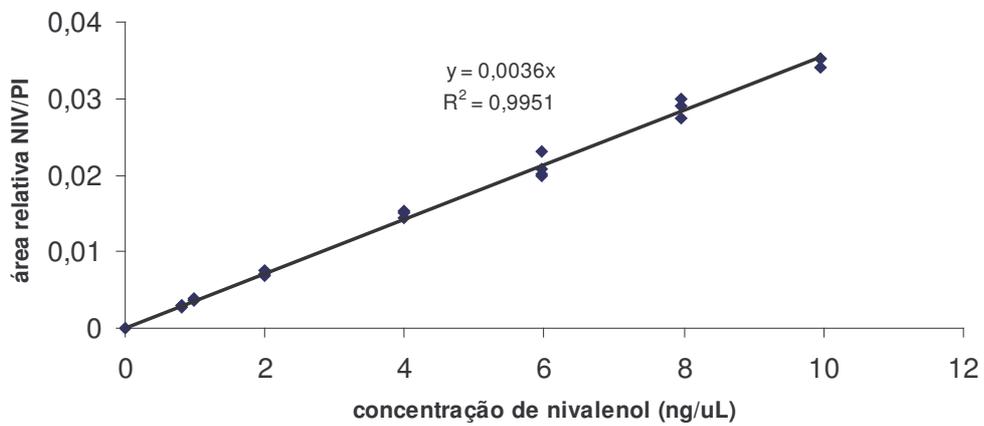


FIGURA 35 - CURVA DE CALIBRAÇÃO INTERNA DE NIVALENOL (NIV)

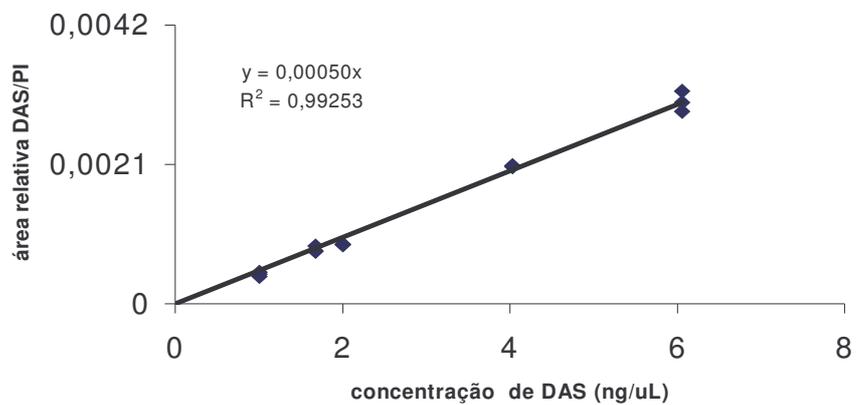


Figura 36 - Curva de calibração interna de diacetoxiscirpenol (DAS)

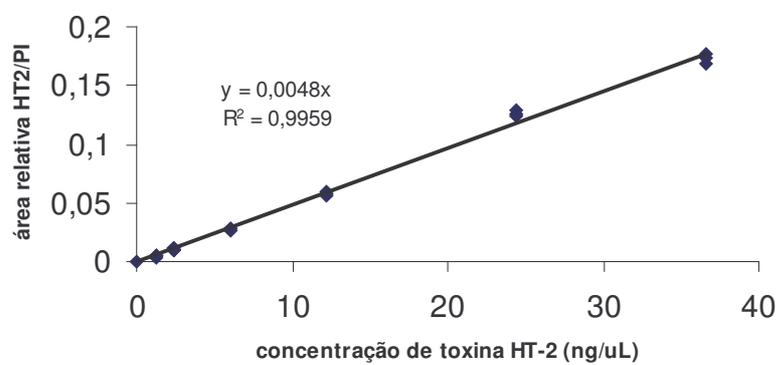


FIGURA 37- CURVA DE CALIBRAÇÃO INTERNA DA TOXINA HT-2 (HT2)

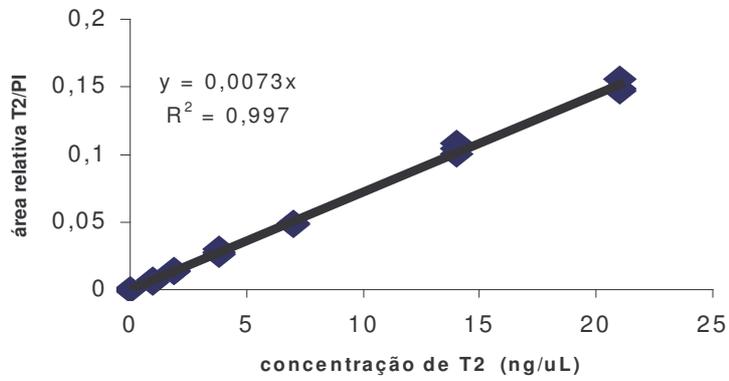


FIGURA 38 - CURVA DE CALIBRAÇÃO INTERNA DA TOXINA T-2 (T2)

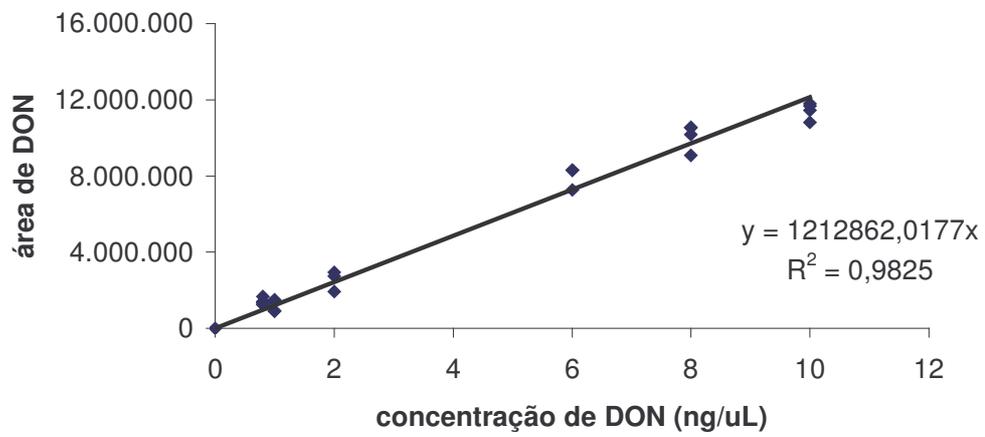


Figura 39 - Curva de calibração externa de desoxinivalenol (DON)

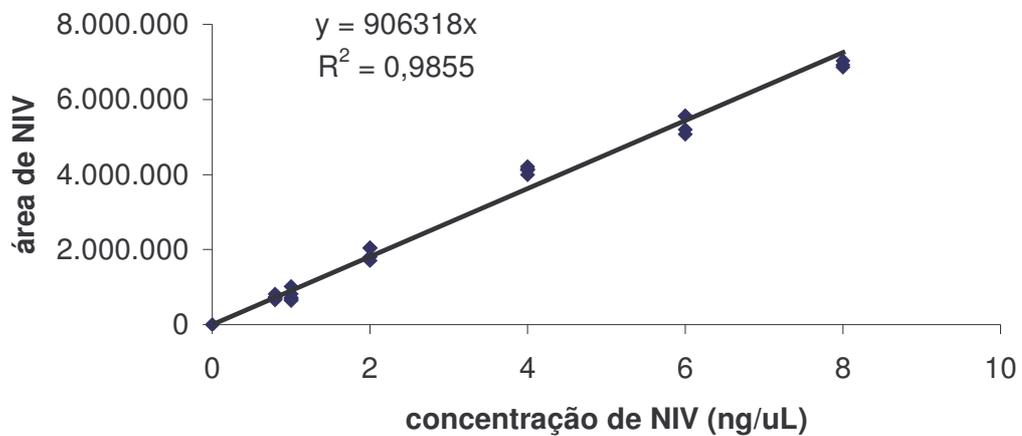


Figura 40 - Curva de calibração externa de nivalenol (NIV)

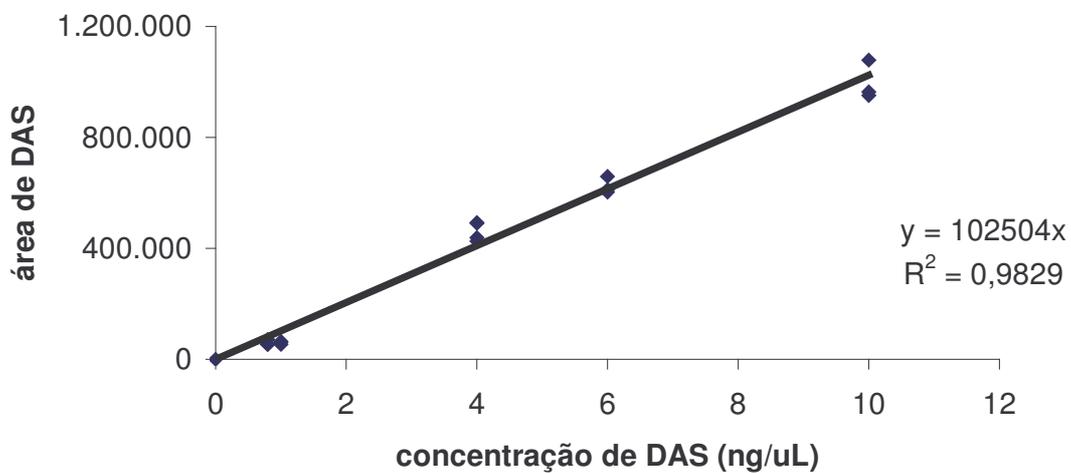


Figura 41 - Curva de calibração externa de diacetoxiscirpenol (DAS)

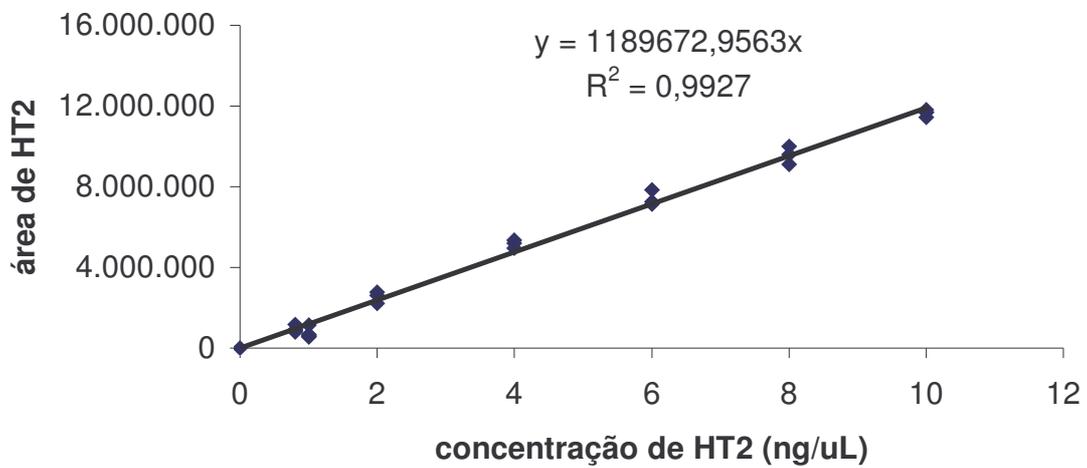


Figura 42 - Curva de calibração externa da toxina HT-2 (HT2)

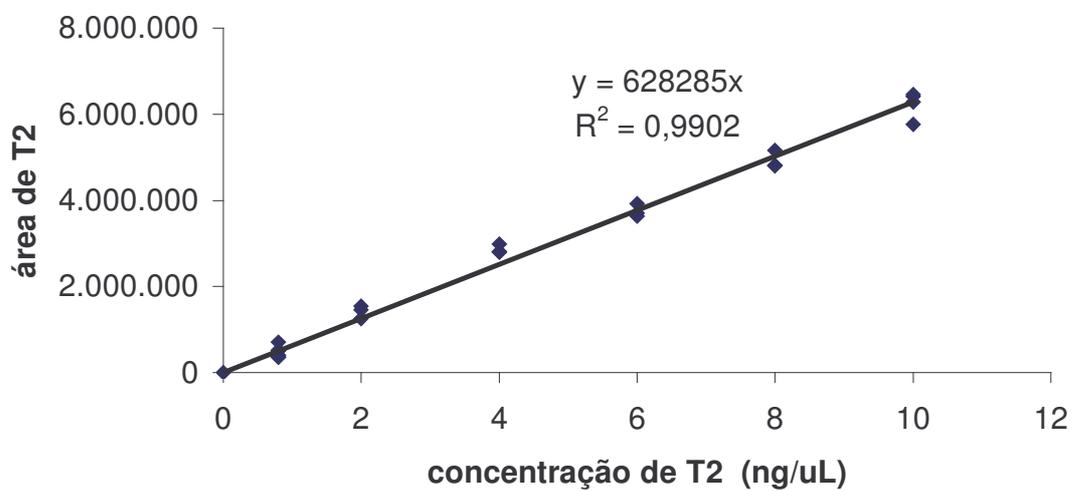


Figura 43 - Curva de calibração externa da toxina T-2 (T2)

Os resultados das recuperações e dos limites de detecção e quantificação (Tabelas 11 e 12) em amostras de produtos de milho foram superiores aos obtidos nas amostras de milho de cooperativas. O efeito matriz foi muito grande. Segundo PLATTNER et al. (1989) na maioria dos casos é o ruído químico, e não a sensibilidade, o fator limitante na análise de uma micotoxina, em particular num sistema CG-EM. Ruído químico é considerado como os sinais interferentes produzidos por constituintes estranhos da amostra.

Os limites de detecção foram calculados baseando-se na menor quantidade cujo sinal da relação sinal/ruído fosse três vezes o DPR, desde que o pico cromatográfico do tricoteceno gerasse seu espectro coincidente nos cinco fragmentos escolhidos, assegurando desta forma a comprovação de sua identidade. O limite de quantificação do método, a menor quantidade do analito que pode ser medida com uma precisão especificada, foi considerado como quinze vezes o desvio padrão relativo, os resultados obtidos das diferentes matrizes variaram de acordo com as Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Limites de detecção (ng/g) de derivados trifluoroacetilados de DON, NIV, DAS, HT2 e T2 determinados em milho em grão e produtos de milho por CG-EM

	DON	NIV	DAS	HT2	T2
milho em grão	20	10	40	40	20
canjica	20	30	40	20	60
quirera	20	20	120	50	40
flocos de milho	40	40	20	20	20
farinha de milho	60	40	60	50	20
fubá	30	30	30	30	40
sêmola	50	20	30	30	50
milho em lata	nd	nd	30	30	100

NOTA: valores médios de cinco repetições; nd = não determinado; DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol; HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-

Tabela 12 - Limites de quantificação (ng/g) de derivados trifluoroacetilados de DON, NIV, DAS, HT2 e T2 determinados em milho em grão e produtos de milho por CG-EM

	DON	NIV	DAS	HT2	T2
milho em grão	90	50	180	200	70
canjica	70	120	180	100	300
quirera	70	60	550	220	200
flocos de milho	170	200	60	50	80
farinha de milho	300	200	300	250	100
fubá	120	90	150	150	170
sêmola	220	80	150	150	220
milho em lata	nd	nd	150	150	500

NOTA: valores médios de cinco repetições; nd= não determinado; DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol; HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2

Valores menores de limites de detecção e quantificação foram relatados por aqueles que utilizaram CG-EM *ion-trap* com ionização química. Muitos destes autores adotaram o limite de detecção como sendo igual ao limite de quantificação chegando a valores de 1 a 40 ng/g (SCHOLLENBERGER et al., 1998; SCHWADORF & MULLER, 1991).

Comparando os resultados deste trabalho com os de outros gerados por métodos cromatográficos para detecção e determinação simultânea de tricotecenos, verificamos que, por exemplo, para matrizes como milho, os resultados são próximos. ROSEN & ROSEN (1984) obtiveram para milho recuperações variando de 80 a 100% e DPR entre 1,6 a 14,2%, usando CG-EM com SIM. Para TANAKA et al. (2000) a recuperação variou de 81 a 92% e DPR de 4,4 a 5,7, trabalhando com CG-EM e SIM. Já para RADOVA et al. (1998) a

recuperação para milho variou de 64,5 a 139,5% e os DPR de 5,9 a 30,5, utilizando GC com detector de captura de elétrons.

Duas revisões recentes, LANGSETH & RUNDBERGET(1998) e KRŠKA et al. (2001) concluíram que os métodos de cromatografia são os mais usados e consideraram que a detecção por espectrometria de massas é essencial para se obter resultados confiáveis de tricotecenos presentes em pequenas concentrações. A vantagem deste método é a determinação simultânea de vários tricotecenos.

A CG-EM é uma ferramenta prática e poderosa para detecção simultânea e confirmação de tricotecenos. Utilizou-se impacto de elétrons (IE) e aplicou-se a técnica de reconstituição de íons (fragmentos) do cromatograma, pois o equipamento usado foi *ion trap*. Se o equipamento fosse um do tipo quadrupolo poderia se usar o recurso SIM (selected ion monitoring), o que é muito mais frequente e segundo LANGSETH & RUNDBERGET (1998) proporciona resultados confiáveis. Instrumentos *ion trap* são considerados geralmente muito sensíveis no modo *full scan* (trabalhando com o total dos íons) e comparados a um quadrupolo trabalhando em modo SIM. No equipamento com *ion trap* após a ionização, o dispositivo *trap* é preenchido com íons que tem suas massas analisadas e escaneadas para o detector. E este ciclo se repete até finalizar a análise. Este *trap* tem um número de íons máximo limitado em cada ciclo, isto significa que se houverem mais íons provenientes de co-extrativos da amostra, ou mesmo do sangramento da coluna, eles irão competir com os íons dos analitos e provavelmente suprimí-los (ROACH et al., 2000). Este é um dos motivos que se recomenda o uso de colunas com baixo sangramento e é também considerado um dos pontos fracos deste equipamento, pois há uma grande população de íons dentro do *trap*. Este fenômeno, supressão de íons, talvez tenha influenciado em algumas amostras que tiveram recuperações menores. Nas recuperações com valores mais altos pode ter havido uma coincidência dos íons escolhidos para RIC, também fazerem parte da constituição da amostra.

Por vezes os resultados nem sempre são lineares. Além disso, segundo VÉKEY (2001) a principal desvantagem de um instrumento com *íon-trap* é que a pressão dentro do *íon source* tem uma influência crítica na qualidade do espectro. E isto é mais crucial quando se tem impacto de elétrons, pois pode ocorrer o que se conhece por *self-ionization*, os íons se auto-ionizam. Este fenômeno pode prejudicar a quantificação, alterando a quantidade de amostra e consequentemente a sensibilidade pode mudar drasticamente. É importante estar alerta para isto, e justamente por este motivo os equipamentos *íon trap* não são os mais indicados para quantificação com impacto de elétrons e sim por ionização química (SCHOLLENBERGER et al., 1998). Entretanto este estudo conseguiu superar, pelo menos em parte, estes problemas e os valores de recuperação e DPR estão semelhantes a de outros trabalhos citados na literatura

CONCLUSÕES

A extração utilizando acetonitrila e água (84 + 16, v/v) e a limpeza com coluna MycoSep 227 foi o método mais adequado para a determinação simultânea dos tricotecenos DON, NIV, DAS, HT2 e T2 em milho e produtos de milho, por cromatografia a gas associada à espectrometria de massas. Em termos de derivação, o uso de anidrido trifluoroacético em presença de bicarbonato de sódio, produziu melhores resultados mais sensíveis, menos interferentes e boa estabilidade.

Os cromatogramas foram reconstituídos com os fragmentos mais característicos para reduzir o efeito matriz, com bons resultados. Para quantificação, foi empregada a padronização interna para a maioria das amostras, milho em grão, fubá, farinha de milho, canjica, sêmola, flocos de milho e quirera. A padronização externa foi usada para amostras especialmente difíceis como foi o caso de milho verde em lata.

As recuperações variaram para o milho e seus diversos produtos de 83,3 a 105,7 % para DON, 84,6 a 114,5% para NIV, 52,1 a 122,7% para DAS, 71,1 a 92,9 % para T2 e de 81,8 a 155,4 % para HT2. Os limites de detecção variaram de 20 a 50 ng/g para DON, de 10 a 40 ng/g para NIV, de 30 a 120 ng/g para DAS, de 20 a 50 ng/g para HT2 e de 20 a 100 ng/g para T2. Os limites de quantificação variaram de 70 a 300 para DON, de 50 a 200 ng/g para NIV, de 60 a 300 ng/g para DAS, de 50 a 250 ng/g para HT2 e de 70 a 500 ng/g para T2.

A repetibilidade do método mostrou desvios padrão relativos (DPR) variados de acordo com o tipo de amostra e de tricoteceno, variando de 4,8 a 18,1 para DON, 3,5 a 13,4 para NIV, 3,8 a 35,7 para DAS, 3,3 a 16,0 para HT2 e de 5,0 a 33,6 para T2. As amostras que mostraram maiores valores de DPR e limites de detecção e quantificação foram aquelas que apresentaram maior quantidade de co-extrativos nos seus cromatogramas, em especial milho em lata e farinha de milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, J.F.; CAMPBELL, H.M.; PROVOST, L.; RENAUD, S. Determination of vomitoxin and other trichothecene mycotoxins in feeds by GC/ion trap MS with acetonitrile chemical ionization. Comunicação pessoal referente à poster apresentado em Montreal/ Canada no AOAC Meeting de 1998.

CAULCUTT, R.; BODDY, R. **Statistics for Analytical Chemists**. London: Chapman and Hall (ed.). 1983.

ESKOLA, M.; PARIKKA, P.; RIZZO, A. Trichothecenes, ochratoxin A, and zearalenone contamination and *Fusarium* infection in Finnish cereal samples in 1998. **Food Additives and Contaminants**, v.18, n.8,p.707-718, 2001.

FURLONG, E.B. **Tricotecenos em trigo: um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo.** Campinas, 1992. 120f. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

FURLONG, E.B.; SOARES, L.M.V. Gas chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. **Journal of AOAC International**, v.78, n.2, p.386-390, 1995.

HENRY, C.M. GC/MS Not the same old combination. **Analytical Chemistry News and Features**, June 1, 401 A-406A, 1999.

HORWITZ, W.; KAMPS, L.R.; BOYDER, K.W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v.63, n.6, p.1344-1354, 1980.

IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER . **Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenone X.** In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human; some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC, 1993, p.467- 488.

KIENTZ, C.E.; VERWEIJ, A. Trimethylsilylation and trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silica capillary columns. **Journal of Chromatography** , v. 355, p.229-240, 1986.

KOTAL, F.; HOLADOVÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J.; POUŠTKA, J.; RADOVÁ, Z. Determination of trichothecenes in cereals. **Journal of Chromatography A**, v. 830, p. 219-225, 1999.

KRISHNAMURTHY, T.; SARVER, E.W. Mass spectral investigations on trichothecene mycotoxins. III. Synthesis, characterization and applications of pentafluoropropionyl and trifluoroacetyl esters of simple trichothecenes. **Journal of Chromatography** , v. 355, p.253-264, 1986.

KRSKA,R. Performance of modern samples preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. **Journal of Chromatography A**, v.815, p.49-57, 1998.

KRSKA , R.; BAUMGARTNER, S.; JOSEPHS, R. The-state-of- art n the analysis of type-A and type-B trichothecene mycotoxins in cereals. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, p. 285-299, 2001.

LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T. Instrumental methods for determination of non macrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures (review). **Journal of Chromatography A**, v.815, p.103-121, 1998.

MAROCHI, M.A. ; SOARES, L.M.V. Metodologia para determinação de tricotecenos e zearalenona em grãos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.1-8, 1993.

MAROCHI, M.A.; SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P.Z. Testes confirmatórios para tricotecenos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.56, n.2, p.17-20, 1996.

MATEO, J.J.; LLORENS, A.; MATEO, R.; JIMÉNEZ, M. Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. **Journal of Chromatography A**, n. 918, p. 99-112, 2001.

MCLACHLAN, A.; SHAW, K.J.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; NGUYEN, T.H.L. Production of trichothecene mycotoxins by Australian *Fusarium* species. **Food Additives and Contaminants**, v.9, n.6,p.631-637, 1992.

MIROCHA, C.J.; PATHRE, S.V.; PAWLOSZY, R.J.; HEWETSON, D.W. Mass spectra of selected trichothecenes. In: R.J.COLE (ed.) **Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins** Orlando: Academic Press, 1986, cap.13, p.353-392.

OLIVEIRA, A.Q. Tricotecenos em milho: uma avaliação de métodos analíticos e da incidência em milho pipoca. 2001. 132f. Dissertação (mestrado)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.

OLIVEIRA, A.Q.; SOARES, L.M.V. Avaliação de métodos para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.2, p. 129-134, 2001.

ONJI, Y.; AOKI, Y.; TANI, N.; UMEBAYASHI,K.; KITADA, Y.; DOHI, Y. Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 815, p. 59-65, 1998.

PASCALE, M.; HAIDUKOWSKI, M.; VISCONTI, A. Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthroylnitrile. **Journal of Chromatography A**, n. 989, n.2, p. 257-264, 2003.

PLATTNER, R.D.; BEREMAND, M.N.; POWELL, R.G. Analysis of trichothecene mycotoxins by mass spectrometry and tandem mass spectrometry. **Tetrahedron**, v.45, n.8, p.2251-2262, 1989.

RADOVÁ , Z.; HOLADOVÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. **Journal of Chromatography A**, v. 829, p.259-267, 1998.

ROMER, T.R. Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxin in food and feeds. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.69, n.4, p.599-703, 1986.

ROACH, J.A.G.; WHITE, K.D.; TRUCKSESS, M.W.; THOMAS, F.S. Capillary gas chromatography/mass spectrometry with chemical ionization and negative ion detection for confirmation of identity of patulina in apple juice. **Journal of AOAC International**, v.83, n.1,p.104-112, 2000.

ROOD Jr, H.D.; BUCK, W.B.; SWANSON, S.P. Gas chromatography screening method for T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, and related trichothecenes in feeds. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.71, n.3, p.493-498, 1988.

ROSEN, R.T.; ROSEN, J.D. Quantification and confirmation of four *Fusarium* mycotoxins in corn by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. **Journal of Chromatography** , v. 283, p. 223-230, 1984.

SCHOTHORST, R.C.; JEKEL, A.A. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionization detection. **Food Chemistry**, v.73, p. 111-117, 2001.

SCHOLLENBERGER,M.; LAUBER,V.; TERRY JARA,H.; SUCHY, S.; DROCHNER,W.; MÜLLER,H-M. Determination of eight trichothecenes by gas-chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p.123-132, 1998.

SCHUHMACHER,R.; KRŠKA,R.; WEINGAERTNER, J.; GRASSERBAUER,M. Interlaboratory comparison study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol in wheat and zearalenone in maize using different methods. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.359, p. 510-515, 1997.

SCHWADORF,K.; MÜLLER,H-M. Determination of trichothecenes in cereals by gas-chromatography with ion-trap detection. **Chromatographya**,v.32, n.3/4, p.137-142, 1991.

SNYDER, A.P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecenes mycotoxins mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v.49, n.7, p.544-569, 1986.

TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; MATSUKI, Y.; UENO, Y. A survey of the occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in foodstuffs and health foods in Japan. **Food Additives and Contaminants**, v.2, p.259-265,1985.

TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; YAMAMOTO, S.; LEE, U.S.; SUGIURA, Y.;UENO, Y. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.36, p.979-983, 1988.

TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA,Y.;UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.882, p.23-28, 2000.

TAYLOR, J.K. **Quality assurance of chemical measurements**. Chelsea: Lewis Publishers, 1987,79p.

UENO, Y. Trichothecene: chemical, biological and toxicological aspects. In: UENO, Y. (Ed.). **Development in Food Science**. Tokyo :Elsevier, v.4, 1983.

UENO, Y. Trichothecenes as environmental toxicants. **Review in Environmental Toxicology 2**, p.303-341, 1986.

VÉKEY, K. Mass Spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 921, p. 227-236, 2001.

WEBB, K.; SARGENT, M. The reliability of mass spec. for identification purposes. **VAM Bulletin**, n.22, p.12-14, 2000.

WETTER, M.T.; TRUCKSESS, M.W.; ROACH, J.A.; BEAN, G.A. Occurrence and distribution of *Fusarium graminearum* and deoxynivanenol in sweet corn ears. **Food Additives and Contaminants**, v.16, p.119-124, 1999.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health Criteria 105. **Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot**. IPCS (International Programme on Chemical Safety). Geneva:1990, cap. 2, p: 71-164.

Capítulo 3

INCIDÊNCIA DE TRICOTECENOS (DON, NIV, DAS, T2 E HT2) EM AMOSTRAS DE PRODUTOS DE MILHO COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE SÃO PAULO

RESUMO

A incidência de tricotecenos foi avaliada em produtos de milho comercializados na cidade de São Paulo. Foram adquiridas 78 amostras em estabelecimentos comerciais de diversas regiões da cidade de São Paulo. Os produtos examinados foram farinha de milho comum, farinha de milho pré-cozida, canjica, sêmola, fubá, flocos de milho, milho verde enlatado e quirera. A análise foi conduzida com uma extração com acetonitrila aquoso e limpeza com coluna MycoSep 227. Foi realizada derivação com anidrido trifluoroacético (TFAA) e os tricotecenos determinados e confirmados por cromatografia a gás associada à espectrometria de massas. As recuperações médias variaram de 83 a 113% para desoxinivalenol (DON), de 85 a 115% para nivalenol (NIV), de 69 a 123% para diacetoxiscirpenol (DAS), de 82 a 155% para toxina HT-2 (HT2) e de 71 a 96% para toxina T-2 (T2). Apenas duas amostras apresentaram contaminação. Uma delas de farinha de milho pré-cozida apresentou traços de DON e NIV e outra de quirera níveis de 555 ng/g de T2 e 767 ng/g de HT2. Os resultados mostraram uma pequena ocorrência de tricotecenos em produtos de milho comercializados na cidade de São Paulo. Os níveis de DON e NIV foram baixos e não causam maiores preocupações. Os níveis de T2 e HT2 foram elevados indicando mais estudos devem ser conduzidos em quirera de milho.

palavras chave: cromatografia gasosa, espectrometria de massas, incidência, produtos de milho, tricotecenos,

INTRODUÇÃO

Tricotecenos são um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por espécies de *Fusarium* (UENO, 1983), que têm em comum uma estrutura caracterizada por um sistema de anel 12, 13 – epoxitricotecano (SHARMA & KIM, 1991). Os tricotecenos podem ser divididos em quatro grupos (A, B, C e D), de acordo com características estruturais. Sendo os dos grupos A e B os de maior ocorrência natural em alimentos e rações. Entre eles destacam-se o diacetoxiscirpenol (DAS) e as toxinas T2 (T2) e HT2 (HT2), pertencentes ao grupo A e os do grupo B, desoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV) (CIEGLER, 1978; SCOTT et al., 1997; TANAKA et al., 1988).

Há evidências de que o consumo de rações e alimentos com tricotecenos causem efeitos tóxicos, resultando em recusa alimentar, vômito, diarreia, anorexia, alterações hematológicas e imunológicas e até morte (CIEGLER, 1978; IARC, 1993; SNYDER, 1986; UENO, 1983).

A contaminação de cereais como milho, trigo, aveia, cevada com tricotecenos tem sido relatada em nível mundial (TANAKA et al., 1988). O milho em particular é um dos substratos mais contaminados (ABBAS et al., 1986; CHULZE et al., 1989; KIM et al., 1993; LAUREN et al., 1991; LUO et al., 1992; OKOYE, 1992; PARK et al., 1996; YAMASHITA et al., 1995). Levantamentos realizados em produtos industrializados à base de milho ainda são incipientes (PATEL et al., 1996; OMURTAG & YAZICIOGLU, 2001; SCHOLLENBERGER et al., 1999). A ocorrência de tricotecenos em milho no Brasil começa, no entanto, a ser documentada. PRADO et al. (1997) detectaram a presença de DON em cerca de 6% de milho pós-colheita com níveis variando de 102 a 542 ng/g. Uma única amostra estava contaminada com T2 com nível de 104 ng/g de T2. OLIVEIRA et al. (2001) observaram a presença de DON em cerca de 5-6% de milho pipoca, em níveis variando de 30 a 770 ng/g.

Alguns levantamentos de ocorrência de tricotecenos em produtos derivados ou à base de milho foram realizados. PATEL et al. (1996) analisaram várias comidas étnicas e naquelas à base de milho, detectaram DON em farinha de milho com níveis variando de 17 a 67 ng/g. SCHOLLENBERGER et al. (1999) analisaram vários produtos comercializados no sudoeste da Alemanha. Em produtos à base de milho os autores detectaram DON em quatro das seis amostras analisadas com níveis variando de 15 a 61 ng/g. OMURTAG & YAZICIOGLU (2001) pesquisaram a ocorrência de T2 em produtos para consumo humano e encontraram 1,07 µg/g de T2 em uma de quatro amostras de flocos de milho; uma única amostra de amido de milho contendo 0,98 µg/g da toxina; também uma única amostra de milho congelado com 1,70 µg/g e em cinco de seis amostras de milho seco, T2 variando de 0,45 a 1,10 µg/g. Na América do Sul, levantamento realizado em milho argentino mostrou que das 58 amostras de milho analisadas 24% apresentaram DON, níveis variando de 200 a 400 ng/g (CHULZE et al., 1989).

Uma gama de métodos foram desenvolvidos para determinação destas micotoxinas, utilizando cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida, cromatografia gasosa e imunoenaios (SNYDER, 1986; SCOTT, 1982; WHO, 1990). A cromatografia a gás associada à espectrometria de massas tem-se destacado como uma das melhores técnicas analíticas para estas toxinas porque, além de permitir detecção e quantificação simultânea de tricotecenos dos grupos A e B, fornece identificação inequívoca (SCHWADORF & MÜLLER, 1991).

Tendo em vista a importância do milho e sus derivados para a dieta das populações e a escassez de dados sobre a ocorrência de tricotecenos nestes alimentos no Brasil, o presente trabalho teve como objetivo a verificação da ocorrência de desoxinivalenol, nivalenol, diacetoxiscirpenol, toxinas T2 e HT2 em produtos à base de milho, para consumo humano.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Um total de 78 amostras consistindo de doze amostras de fubá, nove amostras de farinha de milho comum, onze amostras de farinha de milho pré-cozida, dez amostras de canjica, duas amostras de sêmola de milho, vinte amostras de milho verde em lata, oito amostras de flocos de milho (*corn flakes*) e seis amostras de quirera foram utilizadas. Estas amostras foram adquiridas no período de Novembro de 2000 a Janeiro de 2002, de várias regiões no comércio da cidade de São Paulo. Foram coletadas pelo menos duas amostras de cada marca encontrada, sempre de lotes diferentes e não menos de 1Kg.

2. Padrões

2.1. Tricotecenos: desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas T2 (T2) e HT2 (HT2) da SIGMA (St. Louis, MO, EUA). As soluções estoques, variando de 100 µg/mL a 220 µg/mL, foram preparadas individualmente. As concentrações foram calculadas de acordo com as massas obtidas por diferença de massas dos respectivos frascos com e sem toxina. Para tal utilizou-se balança analítica com precisão de $\pm 0,01$ mg. Foram preparadas duas concentrações para soluções de trabalho, a primeira variou de 30 a 70µg/mL e a segunda para cerca de 1µg/mL, sendo que DON e NIV foram diluídos em acetonitrila e DAS, T2 e HT2 em metanol. As soluções foram acondicionadas em frascos bem fechados, protegidos da luz e armazenados no congelador a -18°C.

2.2. Padrão interno: alfa-cloralose da SIGMA (St. Louis, MO, EUA). Solução estoque 400 µg/mL em metanol e solução de trabalho 80 µg/mL em metanol grau cromatográfico, acondicionadas em frasco âmbar a -18°C.

3. Solventes e Reagentes: bicarbonato de sódio (NaHCO_3), sulfato de sódio anidro [Na_2SO_4], acetonitrila, metanol, tolueno, grau analítico. Solventes grau cromatográfico: acetonitrila, metanol, tolueno. Reagente para derivação: anidrido trifluoroacético, da SIGMA (St. Louis, MO, EUA).

4. Colunas para limpeza do extrato: colunas de extração de fase sólida MycoSep 227, Romer Labs (Union/MO, EUA).

5. Equipamentos

Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas, modelo GCQ da Finnigan MAT com detector *ion trap* (Austin, TE, EUA). Coluna capilar Rtx-5MS (5% difenil-95% dimetil polisiloxano) 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase estacionária (Restek Corporation, Bellefonte, PA, EUA). Injetor splitless, volume de injeção 1 μL e tempo de splitless 1 min. Gás hélio com pureza 99,999% (Air Liquid do Brasil, São Paulo, SP). Velocidade linear do gás: 40cm/s. Processador de dados EXCALIBUR 1.1 (San Jose, CA, EUA) usando impacto de elétrons. Energia de ionização: 70 eV. Usando modo *full scan*, cromatograma com os íons totais (TIC) e cromatograma do íon reconstituído (RIC) para quantificação. Temperatura da fonte de íons: 200°C e da linha de transferência (transfer line): 275°C. Condições da programação: injetor a 260°C; programação do forno: 80°C/0,20 min, até 205°C a 22°C/min, 205°C/0,25 min, e até 270°C a 2°C/min.

Calibração do cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas: o detector foi calibrado de acordo com especificações do fabricante (manual THERMO Finnigan – *Polaris Q Hardware Manual*, revisão B p.3-42). As massas indicadas para calibração usando o gás perfluorobutilamina (PFTBA) também conhecido por FC-43, foram de m/z 50 a 650: m/z 69 = 54% \pm 20%; m/z 131 = 100%; m/z 264 = 45 \pm 20%; m/z 414 = 8% \pm 5%; m/z 502 = 6% \pm 4% e m/z 614 = 0,7% \pm 0,5%.

Liquidificador: 12-speed blender Osterizer (OSTER, SunBeam, Inc, Boca Raton, FL, EUA) ou equivalente.

Moinho-liquidificador: Vita-mix *Blending station* – modelo VMO115A (Vita Corp Mix, Cleveland/OH, EUA) ou equivalente.

Bloco aquecedor com evaporador: sistema e-vap 12 portas Romer Labs, Inc. (1301 Stylemaster Union, MO, EUA) com bloco aquecedor (Fisher Scientific, Pittsburg/PA, EUA) ou equivalente.

Ultrassom: Thornton modelo 17 (Thornton – INPEC, SP, BR) ou equivalente.

Vortex: Fischer Touch Mixer modelo 231 – 2800rpm (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EUA) ou equivalente.

Pipetas automáticas: transferpette digital de 20 a 200 μ L, de 100 a 1000 μ L e de 0,5 a 5 mL (BRAND, Wertheim, Mainz, Alemanha) ou equivalentes.

Micro-seringa: microliter 701N de 10 μ L (Hamilton Co., Reno,NA, EUA)

6. Determinação de tricotecenos

As amostras foram moídas em moinho-liquidificador até 16 *mesh* (1 mm), as amostras de milho verde em lata, tiveram a água, quando presente, escoada, e então trituradas. Todas as amostras foram embaladas em sacos plásticos duplos e armazenadas em congelador a -18°C até o momento da análise.

Foram pesados 25 g da amostra moída e adicionados 100 mL da mistura acetonitrila + água (84+16, v/v). A mistura foi homogeneizada em liquidificador em alta velocidade por 5 minutos. Do filtrado foi retirada uma alíquota de cerca de 7-8 mL e transferida para tubo de reação da coluna MycoSep 227 e efetuou-se a limpeza com esta coluna. Do extrato limpo foi retirada uma alíquota de 4 mL e

transferida para um frasco âmbar. A solução foi seca a 60°C sob corrente de N₂. Ao resíduo foi adicionado 1 mL da solução de trabalho do padrão interno e a derivação foi efetuada.

A derivação executada foi a fluoracetilação descrita por SCHWADORF & MÜLLER (1991) e SCHOLLENBERGER et al. (1998). Inicialmente foi adicionado 1 mL de metanol ao extrato, agitado em *vortex*, e aquecido a 60°C até secar para eliminar umidade. A seguir o resíduo foi suspenso com 200 µL de TFAA e foi adicionado cerca de 10 a 30 mg de bicarbonato de sódio e então aquecido a 80°C por 30 minutos. Após esta etapa o excesso de reagente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em 100 µL de tolueno com agitação manual e ultrassom por 1 min. Foram adicionados 500 µL de água destilada para remover o excesso de reagentes. Após separação das fases, a fase superior de tolueno foi removida com auxílio de pipeta Pasteur para frasco âmbar de 4 mL selado. Sulfato de sódio anidro foi adicionado para remover qualquer resquício de água. Após cerca de 15 min, a fase de tolueno foi transferida para frasco âmbar de 600 µL com tampa forrada com teflon. Foi injetado 1 µL no cromatógrafo. Os cromatogramas dos íons totais resultantes foram reconstruídos utilizando-se cinco/seis fragmentos mais característicos de cada tricoteceno visando desta forma eliminar as interferências e os co-extrativos.

7. Controle de qualidade analítica

As amostras foram analisadas com testes de recuperação consistindo na inclusão de uma amostra controle, sem tricotecenos detectados, por batelada. Nestas amostras controle foram adicionados 0,5 µg/g de DON, NIV, DAS, HT2 e T2. As amostras avaliadas foram analisadas em duplicata, em dias diferentes.

A recuperação e a repetibilidade foram verificadas nestas amostras enriquecidas com os tricotecenos estudados. Os limites de detecção do método

foram calculados como a quantidade de toxina capaz de gerar um sinal maior que três (3) vezes o desvio padrão. Os limites de quantificação foram calculados como sendo quinze (15) vezes o desvio padrão (TAYLOR,1987).

Foram construídas curvas de calibração interna e externa para cada um dos tricotecenos estudados, DON, NIV, DAS, HT2 e T2, usando alfa-cloralose como padrão interno.

8. Confirmação de identidade

A confirmação levou em consideração o tempo de retenção e o espectro de massas do pico cromatográfico obtido, utilizando-se os fragmentos mais característicos (Tabela 1) e a razão da intensidade entre eles (Tabela 2).

Tabela 1- Fragmentos m/z de tricotecenos e padrão interno trifluoroacetilados selecionados para quantificação

TRICOTECENOS ou PI	FRAGMENTOS
Alfa-cloralose (PI)	81, 109, 223, 251,319
Desoxinivalenol	117, 145, 231, 259, 584 *
Nivalenol	229, 257, 359, 371, 696*
Diacetoxiscirpenol	91, 124, 229, 329, 402
Toxina HT-2	121, 138, 180, 341, 455
Toxina T-2	121, 138, 180, 227, 327 e 401

* íon molecular

PI = padrão interno

Tabela 2 – Dados dos tricotecenos trifluoroacetilados fragmentados sob modo impacto de elétrons (70eV)

TRICOTECENO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	FRAGMENTOS DE MASSA (u.m.a.)	RAZÃO DAS INTENSIDADES
Nivalenol	7,49	229	2
		257	1
		359	1-2
Desoxinivalenol	8,69	145	3
		259	2-4
		373	1
Diacetoxiscirpenol	14,15	229	1
		329	1
		402	2-3
Toxina HT-2	17,35	121	5-7
		341	1
		455	2-3
Toxina T-2	23,48	180	3-5
		227	1-2
		327	1
		401	1-2

NOTA: dados referentes à coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Restek Corp.)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Controle de qualidade analítica

As curvas de calibração interna para DON e NIV foram lineares de 0,8 a 10,0 ng/µL, para DAS de 0,8 a 6,0 ng/µL, de 0,8 a 20,0 ng/µL para toxina T2 e de 0,8 a 35,0 ng/µL para toxina HT2. Foram traçadas também curvas de calibração externa que foram utilizadas nas amostras de milho verde em lata, onde os co-extrativos se concentraram no início do cromatograma impedindo desta forma a visualização do padrão interno (PI). As curvas de calibração externa para DAS, HT2 e T2 foram lineares de 0,8 a 10,0 ng/µL .

Os limites de detecção variaram de acordo com as matrizes, de 20 a 60 ng/g para DON, de 20 a 40 ng/g para NIV, de 20 a 120 ng/g para DAS, de 20 a 50 ng/g para HT2 e de 20 a 100 ng/g para T2. Na Tabela 3 estão apresentados os valores de limite de detecção e quantificação para cada uma das matrizes estudadas.

Tabela 3 - Limites de detecção (ng/g) e quantificação (ng/g), de derivados trifluoroacetilados de DON, NIV, DAS, T2 e HT2, determinados em produtos de milho por CG-EM

PRODUTOS	TRICOTECENOS									
	DON		NIV		DAS		HT2		T2	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
canjica	20	70	30	120	40	180	20	180	60	300
quirera	20	70	20	60	120	550	50	550	40	200
flocos de	40	170	40	200	20	60	20	60	20	80
farinha de	60	300	40	200	60	300	50	300	20	100
fubá	30	120	30	90	30	150	30	150	40	170
sêmola	50	220	20	80	30	150	30	150	50	220
milho em lata	nd	nd	nd	nd	30	150	30	150	100	500

LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação; nd = não determinado; DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol; HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2.

Os valores médios de recuperação, para cinco repetições, variaram de 83 a 113% para DON, de 85 a 115% para NIV, de 69 a 123% para DAS, de 82 a 155% para HT2 e de 71 a 96% para T2. Os dados da recuperação estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios de recuperação para DON, NIV, DAS, HT2 e T2 para amostras de produtos de milho

Toxina		canjica	flocos	farinha	fubá	quirera	sêmola	milho
DON	%R média*	105,7	87,2	99,8	113,3	83,3	102,5	nr
NIV	%R média*	99,2	86,7	89,9	112,5	84,8	114,5	nr
DAS	%R média*	122,7	112,3	83,5	69,4	74,2	52,1	116,8
HT2	%R média*	115,9	105,4	155,4	129,2	102,6	140,9	81,8
T2	%R média*	92,9	71,7	95,9	88,4	74,5	83,6	71,1

%Rmédia* = porcentagem de recuperação média de cinco determinações; DP = desvio padrão ; DPR = desvio padrão relativo ; nr = não recuperado; DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol; HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2.

A repetibilidade do método mostrou desvios padrões relativos (DPR = CV = coeficiente de variação) variados de acordo com a toxina e a matriz (Tabela 4), de 4,5 a 18 % para DON, de 4,1 a 13,6 % para NIV, de 3,4 para 48,1% para DAS, de 5,2 até 14,2% para HT2 e de 7,0 a 47,3 % para T2 .

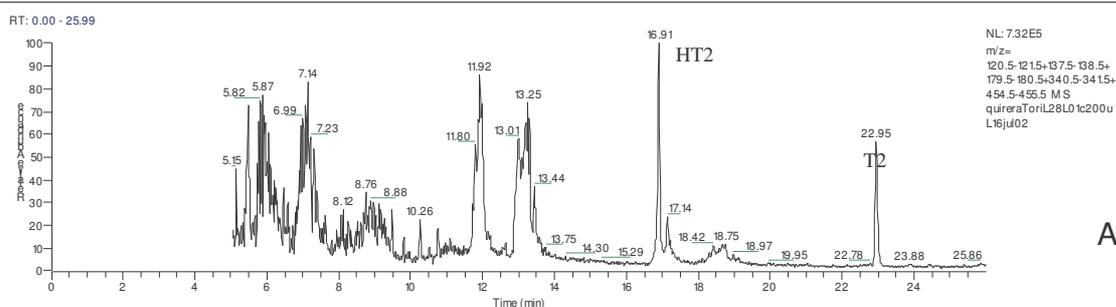
Os dados referentes às recuperações de toxinas HT2, T2 e DAS nas amostras de milho em lata foram calculados com curva de calibração externa pois a região inicial dos cromatogramas destas amostras apresentou forte efeito matriz não permitindo que se registrasse as áreas dos padrões internos.

Houve comprometimento da precisão do método em apenas duas das determinações, DAS em quirera (DPR = 48%) e T2 em milho em lata (DPR= 47%), levando em consideração HORWITZ et al. (1980) que diz que em determinações em nível de ppb o coeficiente de variação (CV= DPR) intralaboratorial pode atingir no máximo a faixa de 20-25%.

2. Ocorrência de tricotecenos

Foram detectados nivalenol e desoxinivalenol em uma amostra de farinha de milho, tipo pré cozida, das onze amostras analisadas. Os valores observados foram superiores aos limites de detecção porém inferiores aos limites de quantificação (traços), estimados ao redor de 166 ng/g para NIV e 167 ng/g para DON. Os níveis encontrados foram baixos. Em uma das seis amostras de quirera analisadas foram detectadas toxinas T2 e HT2, em níveis de 555 e 767 ng/g, respectivamente. Sumarizando, em 78 amostras apenas duas estavam contaminadas, uma com traços de DON e NIV e outra com T2 e HT2. A toxina DAS não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas, e nas amostras de fubá, sêmola, canjica, milho verde em lata e flocos de milho não foram detectados nenhum dos tricotecenos estudados.

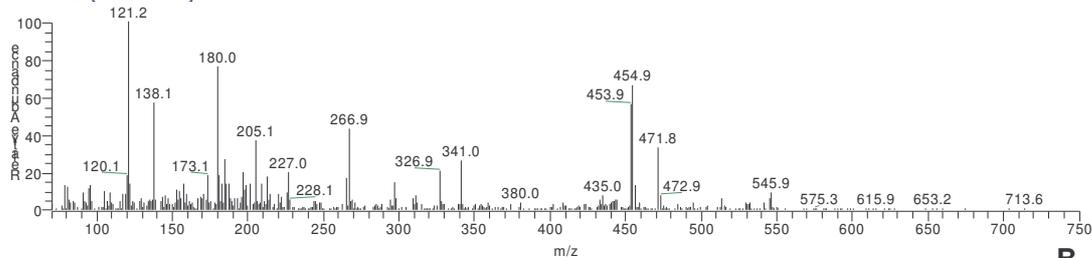
O cromatograma referente a amostra de quirera contaminada com DON e NIV está apresentado na Figura 1. Nas Figuras 2 e 3 estão apresentados os cromatogramas e os espectros de massas referentes da amostra de farinha de milho contaminada com DON e NIV.



A

quireraToril28L01c200uL16jul02 #1092 RT: 16.91 AV: 1 SB: 43 17.17-17.64 NL: 2.10E5

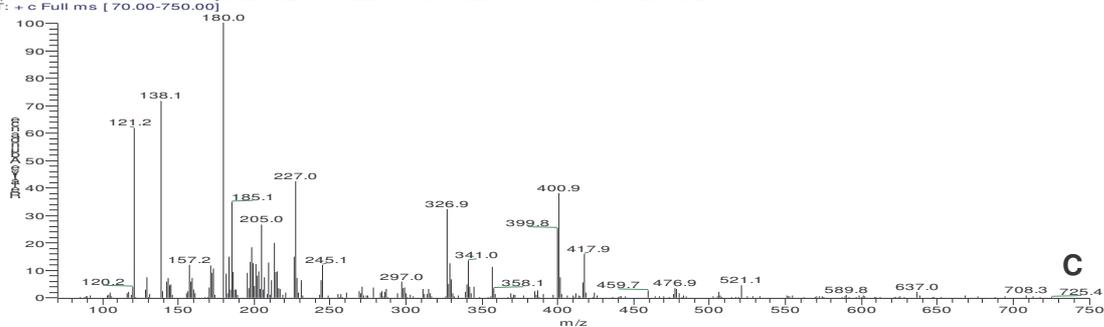
T: + c Full ms [70.00-750.00]



B

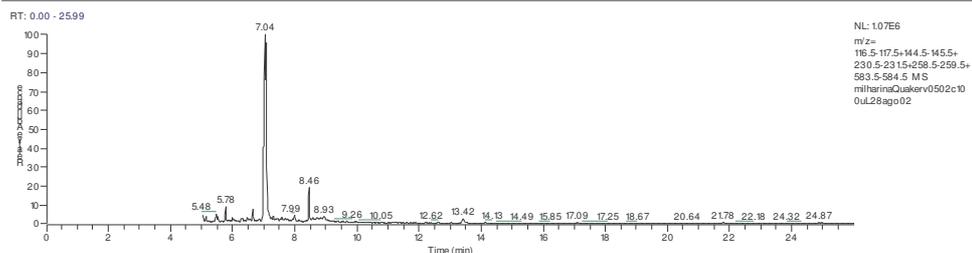
quireraToril28L01c200uL16jul02 #1628 RT: 22.95 AV: 1 SB: 43 17.17-17.64 NL: 1.48E5

T: + c Full ms [70.00-750.00]



C

Figura 1 – Cromatograma obtido a partir de cromatografia a gás/ espectrometria de massas (CG/EM) de amostra de quirera naturalmente contaminada trifluoroacetilada com toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2), 555e 767 ng/g, respectivamente (A); espectro de massas de HT2 referente à amostra contaminada trifluoroacetilada (B) ; espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) de T2 referente à amostra contaminada (C). Derivados trifluoroacetilados, coluna utilizada Rtx-5MS (Restek Corp.)



milharinaQuakerv0502c100uL28ago02 #308 RT: 8.46 AV: 1 SB: 178 8.74-9.96, 6.52-7.26 NL: 5.12E4
T: + c Full ms [70.00-750.00]

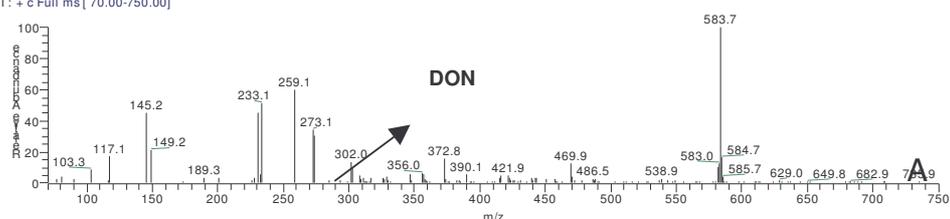
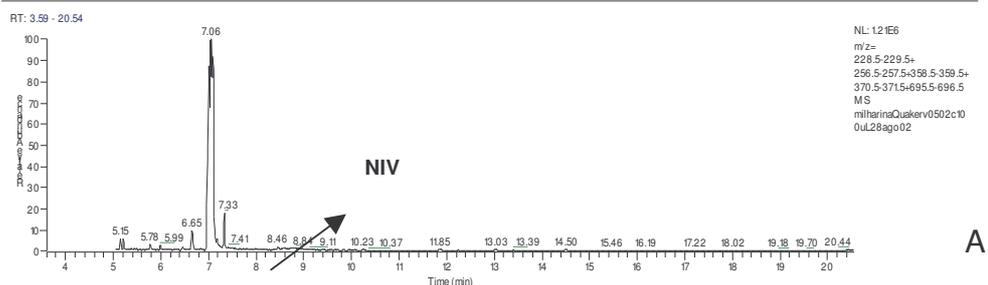


Figura 2 - Cromatograma obtido a partir de CG/EM de amostra de farinha de milho pré-cozida contaminada com traços de desoxinivalenol (DON) (A); espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) de DON referente à esta amostra (B). Derivados trifluoroacetilados, coluna utilizada Rtx-5MS (Restek Corp.)



milharinaQuakerv0502c100uL28ago02 #207 RT: 7.33 AV: 1 SB: 178 8.74-9.96, 6.52-7.26 NL: 3.40E4
T: + c Full ms [70.00-750.00]

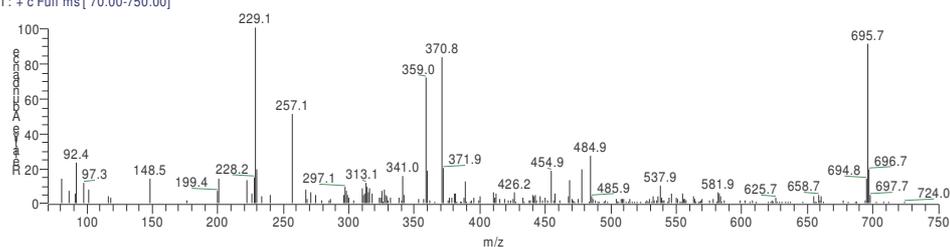


Figura 3 - Cromatograma obtido a partir de CG/EM de amostra farinha de milho pré-cozida trifluoroacetilada com traços de nivalenol (NIV) (A); espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) de NIV referente a A (B). Coluna: Rtx-5MS (Restek Corp.)

Apesar de apenas uma amostra, quirera, ter apresentado contaminação, o fato de serem as toxinas HT2 e T2 é preocupante, pois os valores encontrados foram elevados e a toxina T2 é considerado dos tricotecenos mais tóxicos (IARC, 1993). Observando a legislação e recomendações existentes em nível mundial, encontramos que no Canadá existe uma recomendação de máximo de 100 ng/g de HT2 em ração para gado e aves, e em se tratando de ração para suínos, novilhos e animais em lactação este valor é de 25 ng/g. Israel tem um limite de tolerância para T2 de 100 ng/g em grãos para ração e na Rússia o limite para esta micotoxina em cereais, farinha e farelo de trigo é de 100 ng/g (IARC, 1993; VAN EGMOND, 1989). Ou seja, os níveis encontrados neste trabalho são superiores a qualquer um destes níveis de tolerância ou recomendações que constam na literatura. Cabe ressaltar que as amostras de quirera foram incluídas neste estudo para suprir o baixo número de amostras de sêmola, já que há apenas um fornecedor deste produto no mercado. Uma outra razão para sua inclusão foi o fato de que a quirera apesar de ser usualmente destinada ao consumo animal, é também consumida por pessoas na forma de angu e pratos como a canjiquinha.

Este foi o primeiro estudo de ocorrência de tricotecenos em produtos de milho no Brasil e os resultados aqui encontrados não diferem dos outros poucos relatados na literatura. Os níveis de DON e NIV encontrados na farinha de milho são baixos, podendo ser considerados como traços. A contaminação por DON é esporádica, o valor encontrado é inferior aos valores tolerados ou recomendados. No entanto, os níveis de T2 e HT2 encontrados são preocupantes.

3. Confirmação de identidade

A confirmação da identidade dos tricotecenos foi realizada levando-se em consideração não apenas os tempos de retenção, mas também os espectros de massas referentes aos picos cromatográficos suspeitos, porém principalmente a relação entre os fragmentos mais característicos.

CONCLUSÕES

Das setenta e oito amostras de produtos de milho comercializadas na cidade de São Paulo, analisadas neste trabalho, apenas duas (2,6%) apresentavam contaminação. Uma delas de farinha de milho pré-cozida com DON e NIV nos níveis 166 e 167 ng/g, respectivamente e outra de quirera com 555 ng/g de T2 e 767ng/g de HT2.

Os valores encontrados para DON são baixos, inferiores à recomendação da *Food and Drug Administration*, 1000 ng/g para produtos finais de trigo (FAO,1997). Porém os valores encontrados para as toxinas T2 e HT2 estão acima das recomendações do Canadá, Israel e Rússia.

Os resultados deste trabalho mostram uma pequena incidência de tricotecenos em produtos de milho comercializados na cidade de São Paulo. Desta forma pode-se dizer que baseando-se nestes resultados não há risco para a população no consumo destes produtos de milho com relação às toxinas encontradas e nos valores determinados. Entretanto, mais estudos devem ser conduzidos em quirera, em função dos valores de toxinas T2 e HT2 observados neste tipo de amostra.

O presente trabalho foi o primeiro estudo de incidência de tricotecenos em produtos à base de milho para consumo humano no Brasil e na América Latina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS,H.K.; MIROCHA,C.J.; TUIITE,J. Natural occurrence of deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, and zearalenone in refusal factor corn stored since 1972. **Applied Environmental Microbiology**, v.51, n.4, p.841-843, 1986.

CHULZE, S.; BERTINETTI,C.; DALCERO, A.; ETCHEVERRY, M.; FARNOCHI, C.; TORRES, A.; RIZZO, I.; VARSAVSKY, E. Incidence of aflatoxin, zearalenone, and deoxynivalenol on corn in Argentina. **Mycotoxins Research**, v.5,p.9-12, 1989.

CIEGLER, A. Trichothecenes: occurrence and toxicoses. **Journal of Food Protection**, v.41, n.5, p.399-403, 1978.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Worldwide regulations for mycotoxins** 1995. A Compendium. FAO Roma: Food and Nutrition Paper 64, 1997.43p.

HORWITZ, W.; KAMPS, L.R.; BOYDER, K.W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.63, n.6, p.1344-1354, 1980.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenone X**. In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human; some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, Lyon: IARC,1993, p.467- 488.

KIM, J-C; KANG, H-J; LEE, D-H; LEE, Y-W; YOSHIZAWA, T. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, n.11, p.3798- 3802, 1993.

LAUREN, D.R.; AGNEW, M.P.; SMITH, W.A.; SAYERS, S.T. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in cereals grown in New Zealand in 1986-1989. **Food Additives and Contaminants**, v.8, n.5,p.599-605, 1991.

LUO, Y.; YOSHIZAWA, T.; ZHANG, S-Y.; ZHANG, B-J. A survey of the occurrence of *Fusarium* mycotoxins in corn and wheat samples from Shaanxi and Shanxi provinces, China. **Mycotoxin Research**, n.8, p.85-91, 1992.

OKOYE, Z.S.C. *Fusarium* mycotoxins nivalenol and 4-acetyl-nivalenol (fusarenon-X) in mouldy maize harvested from farms in Jos district, Nigeria. **Food Additives and Contaminants**, v.10, n.4,.631-637, 1992.

OLIVEIRA, A.Q.; SOARES,L.M.V.; SAWAZAKI, E. Survey of deoxynivalenol, diacetoxiscirpenol and T2 toxin in popcorn hybrids planted in the State of Sao Paulo and in popcorn commercializaed in the city of Campinas,SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3, p.330-333, 2001.

PARK, J.J.; SMALLEY,E.B.; CHU, F.S. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in field samples from the 1992 Wiscosin corn crop. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, n.5, p.1642-1648, 1996.

OMURTAG, G.Z.; YAZICIOGLU, D. Occurrence of T-2 toxin in processed cereals and pulses in Turkey determined by HPLC and TLC. **Food Additives and Contaminants**, v.18, n.9, p.844-849, 2001.

PATEL,S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M.; MORTBY, E. Survey of ethic foods for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n.7,p.833-841, 1996.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; FERREIRA, S.O.; CORRÊA, T.B.S.; AFFONSO, B.R.R. Ocorrência natural de desoxinivalenol e toxina T-2 em milho pós-colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.259-262, 1997.

SCHOLLENBERGER,M.; LAUBER,U., TERRY JARA, H.; SUCHY,S.; DROCHNER, W.; MULLER, H.-M. Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v.815, p.123-132, 1998.

SCHOLLENBERGER,M.; SUCHY, S.; TERRY JARA, H.; DROCHNER, W.; MULLER, H.-M. A survey of *Fusarium* toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. **Mycopathologia**, v.147, p.49-57, 1999.

SCHWADORF,K.; MULLER, H.-M. Determination of trichothecenes in cereals by gas chromatography with ion trap detection. **Chromatographia**, v.32 n.3/4, p.137-142,1991.

SCOTT, P.M. Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grains products. **Journal of American Official Analytical Chemists**, v.65, n.4, p.876-883, 1982.

SCOTT, P.M. Multi-year monitoring of Canada grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone. **Food Additives and Contaminants**, v.14 n.4, p.333-339,1997.

SHARMA, R.P.; KIM, Y.-W. Trichothecenes. In: R.P. Sharma and D.K. Salunkhe (Eds). **Mycotoxins and Phytoalexins**, Boca Raton: CRC Press,Inc.,1991, cap.13.

SNYDER, A.P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecenes mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v.49, n.7, p.544-569, 1986.

TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; YAMAMOTO, S.; LEE, U.S.; SUGIURA, Y.;JENO, Y. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.36, p.979-983, 1988.

TAYLOR, J.K. **Quality assurance of chemical measurements**. 2.ed., Lewis Publishers, Chelsea, 1987, 79p.

UENO, Y. Trichothecene: chemical, biological and toxicological aspects. In: UENO, Y. (Ed.). **Development in Food Science**. Tokyo: Elsevier Press, 1983, v.4, 326p.

VAN EGMOND, H.P. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. **Food Additives and Contaminants**, v.6, p.139-188, 1989.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health Criteria 105. **Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot**. IPCS (International Programme on Chemical Safety). Geneva: WHO,1990, cap. 2, p: 71-164.

YAMASHITA, A.; YOSHIZAWA, T.; AIURA, Y.; SANCHEZ, P.C.; DIZON, E.I.; ARIM, R.H.; SARDJONE. *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins in corn from southeast Asia. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.59, n.9, p.1804-1807, 1995.

Capítulo 4

INCIDÊNCIA DE TRICOTECENOS (DON, NIV, DAS, T2 E HT2) EM MILHO PRODUZIDO NO ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO

A incidência de tricotecenos foi avaliada em 80 amostras de grãos de milho produzido no estado de São Paulo. As amostras foram referentes à safra 2001/2002, verão e inverno, provenientes de duas cooperativas (Pedrinhas Paulista e Orlandia) representando duas regiões produtoras do estado de São Paulo. As amostras foram extraídas com acetonitrila e água e submetidas a limpeza com coluna MycoSep 227. A derivação foi realizada com anidrido trifluoroacético (TFAA) e a análise por cromatografia a gás associada à espectrometria de massas. As recuperações médias obtidas foram 86,1%, 84,6%, 101,6%, 89,1% e 71,1% para desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas HT-2 (HT2) e T-2 (T2), respectivamente. Os limites de detecção encontrados foram 20 ng/g para DON e T2, 10 ng/g para NIV, 40 ng/g para DAS e HT2. Das amostras analisadas, 15% apresentaram traços de NIV e DON e cerca de 6% estavam contaminadas com NIV em níveis variando de 51 a 106 ng/g. Apenas uma amostra estava contaminada com ambos, DON e NIV com níveis de 71 ng/g e 68 ng/g, respectivamente. Não foram detectados os tricotecenos DAS, HT2 e T2 nas amostras analisadas.

Palavras-chave: cromatografia a gás, espectrometria de massas, incidência, milho, tricotecenos.

INTRODUÇÃO

Tricotecenos constituem um grupo de substâncias tóxicas produzidas por várias espécies fúngicas dentre elas *Fusarium* (UENO, 1983). Estas substâncias têm em comum uma estrutura caracterizada por um sistema de anel 12, 13 – epoxitricotecano (SHARMA & KIM, 1991). Dentre os tricotecenos com maior ocorrência natural em alimentos e/ou rações estão os dos grupos A como o diacetoxiscirpenol (DAS) e as toxinas T2 (T2) e HT2 (HT2) e os do grupo B, desoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV) (CIEGLER, 1978; SCOTT et al., 1997; TANAKA et al., 1988).

Há evidências de que o consumo de rações e alimentos com tricotecenos sejam tóxicos, resultando em efeitos como recusa alimentar, vômito, diarreia, anorexia, alterações hematológicas e imunológicas e até morte (CIEGLER, 1978; IARC, 1993; SNYDER, 1986; UENO, 1983).

Os tricotecenos têm mostrado incidência mundial em cereais (TANAKA et al., 1988), sendo o milho um dos substratos mais contaminados (ABBAS et al., 1986; CHULZE et al., 1989; KIM et al., 1993; LAUREN et al., 1991; LUO et al., 1992; OKOYE, 1992; PARK et al., 1996; YAMASHITA et al., 1995). Sua ocorrência em milho no Brasil começa a ser documentada. PRADO et al. (1997) verificaram a presença de DON em cerca de 6% de milho pós-colheita, níveis variando de 102 a 542 ng/g e uma única amostra com 104 ng/g de T2. OLIVEIRA et al. (2001) observaram a presença de DON em cerca de 5-6% de milho pipoca, em níveis variando de 30 a 770 ng/g.

Dentre os métodos usados na determinação destas micotoxinas, como cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida, cromatografia a gás e imunoensaios (SNYDER, 1986; SCOTT, 1982; WHO, 1990), a cromatografia a gás associada à espectrometria de massas permite a detecção simultânea de

tricotecenos dos grupos A e B e fornece identificação inequívoca (SCHWADORF & MÜLLER, 1991).

O objetivo do presente estudo foi a avaliação da incidência dos tricotecenos desoxinivalenol, nivalenol, diacetoxiscirpenol, toxinas T2 e HT2 em milho produzido comercialmente no estado de São Paulo, utilizando cromatografia a gás com detector *ion trap* (espectrometria de massas). Estes tricotecenos foram escolhidos por sua comprovada ocorrência natural em grãos e, no caso de DON e NIV por sua maior incidência mundial e, no caso de T2, HT2 e DAS, por sua alta toxicidade.

Material E MÉTODOS

1. Amostras

Foram analisadas amostras de milho amarelo, (*Zea mays*) padrão tipo 2, provenientes de duas cooperativas de milho, uma da região do Vale do Paranapanema (COOP) em Pedrinhas Paulista e outra da Região Mogiana (CAROL) em Orlandia, ambas do estado de São Paulo. A CAROL abrange 48 municípios deste estado, entre eles Orlandia (matriz) , Batatais, Guará, Ipuã, Ituverava, Morro Agudo, Miguelópolis e São Joaquim da Barra. Do silo matriz em Orlandia, foram coletadas 20 amostras de 1 Kg referentes à safra 2001/2002 e mais 20 amostras de milho provenientes do silo Ituverava, referentes à safrinha do ano 2002.

Foram coletadas 20 amostras referentes à safra 2001/2002, e mais 20 amostras referentes ao milho colhido na safrinha na Cooperativa de Pedrinhas Paulista (COOP), que representa a área do Vale do Paranapanema. As amostras referentes a safra 2001 foram coletadas dos silos onde estavam armazenadas, tomadas de várias locais, combinadas e homogeneizadas. Sub-amostras de 1 kg

foram entregues ao laboratório. As amostras referentes à safrinha foram colhidas o movimento de carga, garantindo a representatividade das amostras. As cooperativas não dispõem de informações sobre as variedades de milho. As amostras de milho foram moídas até 16mesh (1 mm), embaladas em sacos plásticos duplos armazenados em congelador a -18°C até o momento da análise.

2. Padrões

2.1. Tricotecenos: desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas T2 (T2) e HT2 (HT2) da SIGMA (St. Louis, MO, EUA). As soluções estoques, variando de $100\ \mu\text{g/mL}$ a $220\ \mu\text{g/mL}$, foram preparadas individualmente. As concentrações foram calculadas de acordo com as massas obtidas por diferença de massas dos respectivos frascos com e sem toxina. Para tal utilizou-se balança analítica com precisão de $\pm 0,01\ \text{mg}$. Foram preparadas duas concentrações de solução de trabalho, a primeira variando de 30 a $70\ \mu\text{g/mL}$ e a segunda para cerca de $1\ \mu\text{g/mL}$, sendo que DON e NIV foram diluídos em acetonitrila e DAS, T2 e HT2 em metanol. As soluções foram acondicionadas em frascos bem fechados, protegidos da luz e armazenados em congelador a -18°C .

2.2. Padrão interno: alfa-cloralose, SIGMA (St. Louis, MO, EUA). Solução estoque $400\ \mu\text{g/mL}$ em metanol e solução de trabalho $80\ \mu\text{g/mL}$ em metanol grau cromatográfico, acondicionada em frasco âmbar a -18°C .

3. Solventes e Reagentes: bicarbonato de sódio (NaHCO_3), sulfato de sódio anidro [Na_2SO_4] e acetonitrila grau p.a. Solventes grau cromatográfico: acetonitrila, metanol e tolueno. Reagente para derivação: anidrido trifluoroacético, da SIGMA (St. Louis, MO, EUA).

4. Colunas para limpeza dos extratos: colunas de extração fase sólida MycoSep 227, Romer Labs (Union, MO, EUA).

5. Equipamentos

Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas, modelo GCQ da Finnigan MAT com *ion trap* com ionização externa (Austin, TX, EUA). Coluna capilar Rtx-5MS (5% difenil-95% dimetil polisiloxano) 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária, Restek Corporation (Bellefonte, PA, EUA). Injetor *splitless*, volume de injeção 1 µL e tempo de *splitless* 1 min. Injetor: 260°C. Programação da coluna: 80°C/0,20 min, até 205°C a 22°C/min, 205°C/0,25 min, até 270°C a 2°C/min. Gás hélio com 99,999% de pureza (Air Liquid do Brasil, São Paulo, SP, BR). Velocidade linear do gás: 40 cm/s. Condições fixadas para o GCQ: programa de integração dos dados Xcalibur 1.1 (Finnigan MAT, San Jose, CA, EUA), operado com impacto de elétrons. Energia de ionização: 70 eV. Temperatura da fonte de íons: 200°C e da linha de transferência: 275°C. Utilizou-se modo *full scan*, cromatograma com os íons totais (TIC) e cromatograma do íon reconstituído (RIC) para quantificação.

Calibração do cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas: o detector foi calibrado de acordo com especificações do fabricante (manual THERMO Finnigan – *Polaris Q Hardware Manual*, revisão B p.3-42). As massas indicadas para calibração usando o gás perfluorobutilamina (PFTBA) também conhecido por FC-43, foram de m/z 50 a 650: m/z 69 = 54% ± 20%; m/z 131 = 100%; m/z 264 = 45 ± 20%; m/z 414 = 8% ± 5%; m/z 502 = 6% ± 4% e m/z 614 = 0,7% ± 0,5%.

Liquidificador: 12-speed *blender* Osterizer (OSTER, Sunbeam, Inc, Boca Raton, FL, EUA) ou equivalente.

Moinho-liquidificador: Vita-mix *Blending station* – modelo VMO115A (Vita Corp Mix, Cleveland, OH, EUA) ou equivalente.

Bloco aquecedor com evaporador: sistema e-vap 12 portas Romer Labs, Inc. (1301 Stylemaster Union, MO, EUA) com bloco aquecedor (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EUA) ou equivalente.

Ultrassom: Thornton modelo 17 (Thornton – INPEC, São Paulo, SP, BR) ou equivalente.

Vortex: Fischer *Touch Mixer* modelo 231 – 2800rpm (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EUA) ou equivalente.

Pipetas automáticas: *transferpette* digital de 20 a 200 µL, de 100 a 1000 µL e de 0,5 a 5 mL (BRAND – Wertheim, Mainz, Alemanha) ou equivalentes.

Micro-seringa: microliter 701N de 10 µL (Hamilton Co., Reno, NA, EUA)

6. Determinação de tricotecenos

Foi utilizado o método preconizado por Romer Labs, Inc. (Romer, 1986). A 25 g da amostra moída foram adicionados 100 mL da mistura acetonitrila + água (84+16, v/v) e agitada fortemente em liquidificador por cinco minutos. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de cerca de 8 mL e transferida para tubo de reação da coluna MycoSep 227 e efetuou-se a limpeza com esta coluna. Do extrato limpo retirou-se uma alíquota de 4 mL para frasco âmbar que foi seca a 60°C sob corrente de N₂. Neste extrato adicionou-se 1 mL de solução 80 µg/mL de padrão interno e efetuou-se a derivação.

A derivação usada foi uma fluoracetilação usando-se anidrido trifluoroacético (TFAA) de acordo com SCHWADORF& MÜLLER (1991) e SCHOLLENBERGER et al. (1998). Os derivados foram preparados aquecendo-se 200 µL de TFAA e cerca de 10 a 30 mg bicarbonato de sódio a 80°C por 30 minutos. Em seguida o excesso de reagente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em 100 µL de tolueno e 500 µL de água foram adicionados para remover quaisquer resquício dos reagentes. A fase com tolueno foi transferida quantitativamente para um frasco sililado limpo e o excesso de água foi removido com sulfato de sódio anidro. O extrato resultante, cerca de 100 µL de

tolueno, foi transferido para frasco âmbar de 600 µL, fechado com tampa forrada com teflon e injetado 1 µL no cromatógrafo. Os cromatogramas foram reconstituídos utilizando-se cinco/seis fragmentos mais característicos de cada tricotecenos visando desta forma eliminar interferência dos co-extrativos.

7. Controle de qualidade analítica

As amostras foram analisadas com inclusão de testes de recuperação onde uma amostra controle, sem tricotecenos detectados, foi adicionada de 0,5 µg/g de DON, NIV, DAS, HT2 e T2. As amostras avaliadas foram analisadas em duplicata, em dias diferentes.

A recuperação e a repetibilidade foram verificadas nestas amostras sem tricotecenos detectados, que então foram adicionadas de 0,5 µg/g de cada um deles. Os limites de detecção do método foram calculados como a quantidade de toxina capaz de gerar um sinal maior que três vezes o desvio padrão relativo. Os limites de quantificação foram calculados como sendo quinze vezes os valores referentes aos desvios padrão relativos (TAYLOR,1987).

Foram construídas curvas de calibração interna para cada um dos tricotecenos estudados, DON, NIV, DAS, HT2 e T2, usando alfa -cloralose como padrão interno.

8. Confirmação de identidade

A confirmação levou em consideração o tempo de retenção e o espectro de massas do pico cromatográfico, utilizando-se os fragmentos mais característicos (Tabela 1) e a razão da intensidade entre eles (Tabela 2).

Tabela 1- Fragmentos (m/z) de tricotecenos e PI trifluoroacetilados selecionados para quantificação, modo impacto de elétrons (70 eV)

TRICOTECENO OU PI	FRAGMENTOS (m/z)
Alfa-cloralose (PI)	81, 109, 223, 251, 319
Desoxinivalenol	117, 145, 231, 259, 584 *
Nivalenol	229, 257, 359, 371, 696*
Diacetoxiscirpenol	91, 124, 229, 329, 402
Toxina HT-2	121, 138, 180, 341, 455
Toxina T-2	121, 138, 180, 227, 327 e 401

* íon molecular

PI = padrão interno

Tabela 2 – Dados dos tricotecenos DON, NIV, DAS, HT2 e T2 trifluoroacetilados fragmentados no modo impacto de elétrons (70eV)

	TEMPO DE	FRAGMENTOS	RAZÃO DAS
			INTENSIDADES
NIV	7,49	229	2
		257	1
DON	8,69	145	3
		259	2-4
DAS	14,15	229	1
		329	1
HT2	17,35	121	5-7
		341	1
T2	23,48	180	3-5
		227	1-2

NOTA: DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol; HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2; u.m.a. = unidade de massa atômica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

2. Controle de qualidade analítica

Foram traçadas curvas de calibração interna para cada um dos tricotecenos estudados. As curvas de DON e NIV foram lineares de 0,8 a 10,0 ng/μL, para DAS de 0,8 a 6,0 ng/μL, de 0,8 a 20,0 ng/μL para toxina T-2 e de 0,8 a 35,0 ng/μL para toxina HT-2. Os limites de detecção foram 10 ng/g para NIV, 20 ng/g para DON e T2 e 40 ng/g para HT2. A Tabela 3 mostra os valores referentes aos limites de detecção e quantificação para cada uma das micotoxinas estudadas. Os valores médios de recuperação, para cinco repetições, foram 86% para DON, 85% para NIV, 102% para DAS, 89% para HT2 e 71% para T2.

A repetibilidade do método se mostrou adequada com desvios padrões relativos (DPR = CV = coeficiente de variação) de 6,5 % para DON, 2,9% para NIV, 11,6% para DAS, 14,4% para HT2 e 6,4 % para T2.

Tabela 3 - Valores de limites de detecção e quantificação, em ng/g, para desoxinivalenol, nivalenol, diacetoxiscirpenol, toxinas T-2 e HT-2 em milho

Tricotecenos	LIMITE DE DETECÇÃO (ng/g)	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (ng/g)
Desoxinivalenol	20	90
Nivalenol	10	50
Diacetoxiscirpenol	40	180
Toxina HT-2	40	200
Toxina T-2	20	70

2. Ocorrência de tricotecenos

Foi detectado nivalenol em oito (40%) das vinte amostras provenientes da cooperativa CAROL referentes à safra de milho 2001. Seis (30%) destas amostras apresentaram nivalenol em níveis entre os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), este nível de contaminação foi considerado como traços. Estas amostras tiveram seus valores de NIV teoricamente estimados como 11 ng/g, 12 ng/g, 21 ng/g, 28 ng/g, 30 ng/g e 40 ng/g. Duas amostras (10%) apresentaram 55 e 60 ng/g de nivalenol. Do lote de 20 amostras referente à safra 2001 da COOP, apenas uma amostra (5%) apresentou traços de nivalenol, cerca de 14 ng/g.

As vinte amostras de milho safrinha (2002) da cooperativa CAROL não apresentaram nenhum dos tricotecenos estudados. Porém, as amostras da safrinha (2002) referentes à COOP apresentaram o nivalenol. Em sete (35%) das vinte amostras foi detectado nivalenol em nível de ruído, foi possível a detecção de cerca de três a quatro dos fragmentos mais característicos, entre eles o íon molecular sempre esteve presente (696). Porém, os valores de área relativa encontrados não permitiram qualquer tipo de quantificação. Quatro amostras (20%) mostraram traços de nivalenol, valores entre os LD e LQ, estimados em 33 ng/g, 25 ng/g, 40ng/g e 31ng/g. Uma (5%) das amostras apresentou traços de DON, cerca de 20 ng/g. Duas amostras (10%) apresentaram 106 ng/g e 51 ng/g de nivalenol e uma amostra (5%) estava co-contaminada com 71 ng/g de DON e 68 ng/g de NIV.

Sumarizando, do total de 80 amostras analisadas 16 delas (20%) estavam contaminadas com NIV e duas (2,5%) com DON em valores acima do limite de quantificação. Os níveis encontrados foram baixos, 15% das amostras apresentaram traços de NIV e DON e cerca de 6% estavam contaminadas com

NIV em níveis variando de 51 a 106 ng/g. Não foram detectados DAS, HT2 e T2 em nenhuma das amostras.

Os resultados deste trabalho mostram níveis baixos de contaminação por DON e NIV no milho plantado no estado. Porém chama a atenção a ocorrência preferencial de NIV, pois segundo MILLER (1995), as cepas produtoras de nivalenol estão presentes em partes do Japão, Austrália e região da Ásia próxima a ela, e seriam incomuns nas Américas. Outra observação a se fazer é que os níveis de contaminação desta safra 2001/2002 foram baixos, talvez beneficiados por condições ambientais. Os estudos sobre a toxicidade de NIV são ainda escassos, talvez por não ser o tricoteceno de maior ocorrência, mas alguns dados levam a crer que sua toxicidade aguda seja mais elevada do que a de DON (CIEGLER, 1978; WHO,1990), e possivelmente no mesmo nível de toxidez que a toxina T2, a mais tóxica que todas elas (UENO, 1983).

3. Confirmação de identidade

A confirmação foi realizada levando-se em consideração os tempos de retenção, os espectros de massas referentes aos picos suspeitos e principalmente a relação entre os fragmentos mais característicos.

A Figura 1 mostra um cromatograma de amostra de milho naturalmente contaminado com NIV e a Figura 2 apresenta o cromatograma de amostra de milho contaminada com ambos DON e NIV e também seus respectivos espectros de massas para identificação. Os valores de DON e NIV encontrados nesta amostra são pequenos, porém pode-se observar o espectro característico de DON incluindo o seu íon molecular 584 e também o de NIV, íon molecular que é o 696.

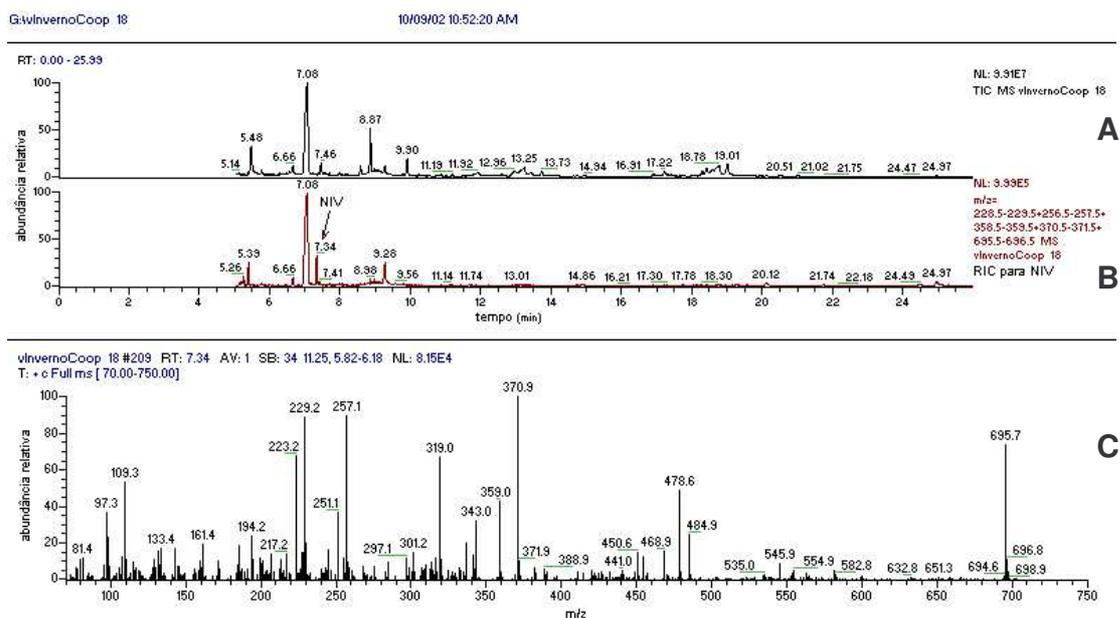


Figura 1 – Cromatograma com os íon totais (TIC) obtido por cromatografia gasosa/ espectrometria de massas de amostra contaminada naturalmente com nivalenol (NIV) e trifluoroacetilada (A); cromatograma reconstruído de (A) com os fragmentos característicos de NIV (B); espectro de massas de impacto de elétrons (70eV) de NIV referente ao mesmo cromatograma (C)

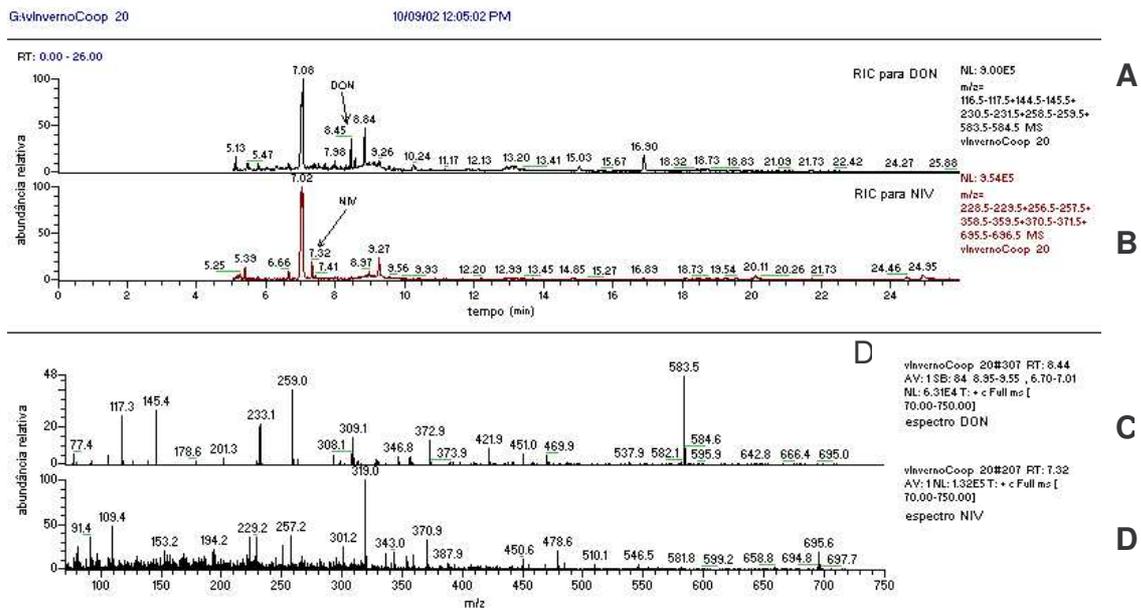


Figura 2 - Cromatograma dos íons reconstituídos (RIC) obtido por CG/EM para desoxinivalenol (DON) de amostra de milho naturalmente contaminada e trifluoroacetilada (A); cromatograma RIC para nivalenol (NIV) da mesma amostra trifluoroacetilada (B); espectro de massas de impacto de elétrons (70eV) de DON referente à amostra contaminada trifluoroacetilada (C); espectro de massas de impacto de elétrons (70eV) de NIV referente à amostra contaminada trifluoroacetilada (D)

CONCLUSÕES

O levantamento da incidência de tricotecenos em milho plantado no estado de São Paulo nas safras 2001/2002 revelou contaminação por NIV em 20% das oitenta amostras analisadas. Cinco (6,3%) das amostras estavam contaminadas com NIV em níveis variando de 51 a 106 ng/g, sendo que uma também apresentava 71 ng/g de DON. Onze amostras (13,8%) apresentaram NIV em níveis de traços, entre os limites de detecção e quantificação, ou seja, entre 10 e 50 ng/g. Uma amostra (1,3%) apresentou DON em nível de traços. Várias amostras apresentaram indicação da presença de NIV, porém em nível de ruído pois o íon molecular 696 estava presente em todas elas, mas não foi possível a confirmação pelas razões entre os fragmentos característicos deste tricoteceno.

Os resultados deste trabalho mostram níveis de DON e NIV baixos no milho comercial plantado no estado e indicam a prevalência do tricoteceno nivalenol. Os níveis desta safra foram baixos, no entanto, não existe presentemente qualquer valor de referência nem recomendação de limite para NIV. O valor encontrado para DON foi também baixo, bem inferior à qualquer uma das recomendações da *Food and Drug Administration* (FAO, 1997) .

Um outro aspecto a salientar é a conhecida ocorrência sazonal das micotoxinas em cereais, as quais variam em incidência e teores de ano para ano, dependendo das condições climáticas. Um quadro completo da incidência de qualquer toxina só pode ser estabelecido após alguns anos de levantamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS,H.K.; MIROCHA,C.J.; TUIE,J. Natural occurrence of deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, and zearalenone in refusal factor corn stored since 1972. **Applied Environmental Microbiology**, v.51, n.4, p.841-843, 1986.

CHULZE,S.; BERTINETTI, C.; DALCER, A.; ETCHEVERRY, M.; FARNOCHI, C.; TORRES, A.; RIZZO,I.; VARSAVSKY, E. Incidence of aflatoxin, zearalenone, and deoxynivalenol on corn in Argentina. **Mycotoxin Research**, v.5, p.9-12,1989.

CIEGLER, A. Trichothecenes: occurrence and toxicoses. **Journal of Food Protection**, v.41, n.5, p.399-403, 1978.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Worldwide regulations for mycotoxins 1995**. A Compendium. Roma: FAO Food and Nutrition Paper 64, 1997.43p.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenone X**. In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human; some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC, Lyon, 1993,p.467- 488.

KIM, J-C; KANG, H-J; LEE, D-H; LEE, Y-W; YOSHIZAWA, T. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, n.11, p.3798- 3802, 1993.

LAUREN, D.R.; AGNEW, M.P.; SMITH, W.A.; SAYERS, S.T. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in cereals grown in New Zealand in 1986-1989. **Food Additives and Contaminants**, v.8, n.5,p.599-605, 1991.

LUO, Y.; YOSHIZAWA, T.; ZHANG, S-Y.; ZHANG, B-J. A survey of the occurrence of *Fusarium* mycotoxins in corn and wheat samples from Shaanxi and Shanxi provinces, China. **Mycotoxin Research**, n.8, p.85-91, 1992.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v.31, n.1, p.1-16, 1995.

OKOYE, Z.S.C. *Fusarium* mycotoxins nivalenol and 4-acetyl-nivalenol (fusarenon-X) in mouldy maize harvested from farms in Jos district, Nigeria. **Food Additives and Contaminants**, v.10, n.4,p.631-637, 1992.

OLIVEIRA, A.Q.; SOARES,L.M.V.; SAWAZAKI, E. Survey of deoxynivalenol, diacetoxiscirpenol and T2 toxin in popcorn hybrids planted in the State of Sao Paulo and in popcorn commercializaed in the city of Campinas,SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3, p.330-333, 2001.

PARK, J.J.; SMALLEY,E.B.; CHU, F.S. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in field samples from the 1992 Wiscosin corn crop. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, n.5, p.1642-1648, 1996.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; FERREIRA, S.O.; CORRÊA, T.B.S.; AFFONSO, B.R.R. Ocorrência natural de desoxinivalenol e toxina T-2 em milho pós-colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.259-262, 1997.

ROMER, T.R. Use of small charcoal/alumina clean-up columns in determination of trichthecene mycotoxins in foods and feeds. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v.69, n.4, p.699-703,1986.

SCHOLLENBERGER,M.; LAUBER,U., TERRY JARA, H.; SUCHY,S.; DROCHNER, W.; MULLER, H.-M. Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v.815, p.123-132, 1998.

SCHWADORF,K.; MULLER, H.-M. Determination of trichothecenes in cereals by gas chromatography with ion trap detection. **Chromatographia**, v.32 n.3/4, p.137-142,1991.

SCOTT, P.M. Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grains products. **Journal of the Association Official Analytical Chemists**, v.65, n.4, p.876-883, 1982.

SCOTT, P.M. Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.4, p.333-339, 1997.

SHARMA, R.P.; KIM, Y.-W. Trichothecenes. In: R.P. Sharma and D.K. Salunkhe (Eds). **Mycotoxins and Phytoalexins**, Boca Raton,Florida, CRC Press, Inc..1991 chapter 13.

SNYDER, A.P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecenes mycotoxins mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v.49, n.7, p.544-569, 1986.

TAYLOR, J.K. **Quality assurance of chemical measurements**. 2.ed., Chelsea: Lewis Publishers, 1987, 79p.

TANAKA,T., HASEGAWA,A., MATSUKI,Y., UENO,Y. A survey of the occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in foostuffs and health foods in Japan. **Food Additives and Contaminants**, v.2, p.259-265,1985.

TANAKA,T., HASEGAWA,A., YAMAMOTO,S., LEE,U.S., SUGIURA,Y., UENO,Y.
Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol,
deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. **Journal of
Agriculture and Food Chemistry**, v.36, p.979-983, 1988.

UENO, Y. Trichothecene: chemical, biological and toxicological aspects. In: Y.
UENO (Ed.). **Development in Food Science**. Tokyo: Elsevier Press. 1983, v.4,
326p.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental and Health Criteria
105. **Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot**. IPCS
(International Programme on Chemical Safety). Geneva, 1990. Trichothecenes.
Chapter 2, 1990, p.71-164.

YAMASHITA, A.; YOSHIZAWA, T.; AIURA, Y.; SANCHEZ, P.C.; DIZON, E.I.;
ARIM, R.H.; SARDJONE. *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, nivalenol, and
zearalenone) and aflatoxins in corn from southeast Asia. **Bioscience
Biotechnology and Biochemistry**, v.59, n.9, p.1804-1807, 1995.

CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho demonstrou a presença de dos tricotecenos DON e NIV em milho cultivado comercialmente no estado de São Paulo.

A predominância de NIV nas amostras de milho cultivado comercialmente indica que este tricoteceno não poder ser ignorado em levantamentos de incidência de tricotecenos em milho produzido no estado de São Paulo e deveria ser investigado em milho cultivado em outras regiões do país.

Os níveis de DON e NIV e a frequência de seu aparecimento nas amostras de milho cultivado no estado de São Paulo foi baixa na safra 2001/2002. No entanto, a conhecida variabilidade na contaminação de grãos por micotoxinas e sua estreita relação com fatores climáticos não permite concluir que a situação encontrada seja a predominante no estado de São Paulo. Apenas após levantamentos realizados durante vários anos será possível obter um panorama completo da incidência de tricotecenos em milho cultivado no estado

DON, NIV, T2 e HT2 foram encontrados em produtos de milho comercializados na cidade de São Paulo. A origem do milho utilizado na fabricação dos produtos examinados é desconhecida, sendo razoável supor que neles predomine milho nacional. Os níveis a incidência de DON e NIV foram baixos e não inspiram preocupação quanto aos produtos de milho comercializados de Novembro de 2000 a Janeiro de 2002 na cidade de São Paulo. Os teores das toxinas T-2 e HT-2 encontrados em uma amostra de quirera, no entanto, excedem recomendações internacionais, são preocupantes e sugerem que a população deveria ser orientada a não consumir este tipo de produto.

Os resultados do presente trabalho indicam que a presença de tricotecenos deveria ser regulada em alimentos nacionais como o milho e que deveria ser objeto de inspeção por órgãos de vigilância sanitária.

