

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**TRICOTECENOS EM MILHO: UMA AVALIAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS E DA INCIDÊNCIA EM MILHO PIPOCA**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Adriana Queiroz de Oliveira, aprovada pela Comissão Julgadora em 08 de fevereiro de 2001.

Campinas, 08 de fevereiro de 2001

*Lúcia Valente Soares*  
Profa. Dra. Lúcia Maria V. Soares  
Presidente da Banca

ADRIANA QUEIROZ DE OLIVEIRA  
Bacharel em Química

Profa. Dra. LÚCIA MARIA VALENTE SOARES  
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos  
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do  
título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas – SP  
2001



UNIDADE	Be
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	OL4t
V.	Ex.
TOMBO BC	44099
PROC.	16-392/01
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC	R\$ 11,00
DATA	25/04/01
N.º CPD	

CM-00154649-8

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

OL4t Oliveira, Adriana Queiroz de  
Tricotecenos em milho: uma avaliação de métodos analíticos e da incidência em milho de pipoca / Adriana Queiroz de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

1.Tricotecenos. 2.Milho. 3.Cromatografia gasosa.  
4.Métodos. I.Soares, Lúcia Maria Valente. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
III.Título.

BANCA EXAMINADORA



---

Profa. Dra. Lúcia Maria Valente Soares  
(orientadora)

---

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong  
(membro)



---

Dra. Myrna Sabino  
(membro)



---

Profa. Dra. Célia Maria de Sylos  
(membro)

**Aos meus pais Benedito e Marisa  
e ao meus irmãos Gustavo e Rodrigo**

**Pelo amor e incentivo**

**Dedico**

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Lúcia Maria Valente Soares pela brilhante orientação, dedicação, carinho e pelo amplo aprendizado que me proporcionou;

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões apresentadas para a redação final do trabalho. Em especial à professora Eliana pelas “dicas” e sugestões durante as análises;

À FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - pela concessão da Bolsa de Estudos;

Ao Engenheiro Agrônomo e Pesquisador Científico do Instituto Agronômico de Campinas , Dr. Eduardo Sawazaki pelo envio dos grãos de milho pipoca das Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Campinas, Mococa e Capão Bonito;

Ao Laboratório de Química de Alimentos do ITAL pela concessão do uso do moinho;

Às minhas amigas Pricila, Luzinha, Luciane, Regina Furlani, e em especial à minha “amiga/irmã” Sílvia pelo suporte nos momentos difíceis e constante incentivo;

Aos os colegas e amigos do Laboratório de Análise de Alimentos: Luciane, Regina Furlani, Miguel, Simone, Marcelo Prado, Jessuí, Márcio Mello, Soraia e Natália, pelo companheirismo e preciosos momentos de descontração;

À Alberto Kupper pelo amor;

À Deus pela força,

Obrigada

# ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	1
GENERAL SUMMARY.....	3
INTRODUÇÃO GERAL.....	5
Capítulo 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
RESUMO.....	9
REVISÃO DA LITERATURA.....	10
1. A cultura de milho no Brasil.....	10
2. Tricotecenos.....	11
2.1. Estrutura química e estabilidade.....	11
2.2. Microrganismos produtores.....	14
2.3. Efeitos tóxicos.....	16
3. Incidência dos tricotecenos.....	20
3.1. Mundial.....	20
3.2. Nacional.....	23
4. Metodologia analítica para a determinação de tricotecenos.....	23
4.1. Métodos cromatográficos.....	24
4.1.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	24
4.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	25
4.1.3. Cromatografia gasosa.....	28
4.2. Imunoensaios.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
Capítulo 2: AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE TRICOTECENOS EM MILHO POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	45
RESUMO.....	47
INTRODUÇÃO.....	47

<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
<b>1. Amostras.....</b>	<b>50</b>
<b>2. Padrões.....</b>	<b>50</b>
2.1. Tricotecenos – desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxina T2 (T2), diacetoxiscirpenol (DAS).....	50
2.2. Padrão interno.....	51
<b>3. Solventes e reagentes.....</b>	<b>51</b>
<b>4. Adsorventes.....</b>	<b>51</b>
<b>5. Equipamentos.....</b>	<b>51</b>
<b>6. Avaliação de reagentes de derivação e melhores condições de derivação.....</b>	<b>52</b>
6.1. Derivação com HFBI.....	52
6.2. Derivação com TFAA.....	52
<b>7. Avaliação de sistemas de extração e limpeza.....</b>	<b>53</b>
7.1. Teste do sistema de extração e limpeza descrito por FURLONG & SOARES (1995).....	53
7.2. Teste do sistema de extração descrito por FURLONG & SOARES (1995) combinado com coluna de Florisil (2g).....	54
7.3. Teste do sistema de extração descrito por FURLONG & SOARES (1995) combinado com coluna de limpeza de alumina:carvão (ROMER, 1986).....	54
7.4. Teste do sistema de extração descrito por LANGSETH & CLASEN (1992) combinado com coluna de limpeza de alumina:carvão (ROMER, 1986).....	54
7.5. Teste do sistema de extração descrito por TANAKA (1985) combinado com coluna de limpeza de alumina:carvão (ROMER, 1986).....	54
7.6. Teste do sistema de extração e limpeza descrito por LAUREN & GREENHALGH (1987).....	55

7.7. Teste do sistema de extração descrito por LAUREN & GREENHALGH (1987) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9: 2,0).....	55
7.8. Teste do sistema de extração descrito por LANGSETH & CLASEN (1992) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9: 2,0) e eluição com acetonitrila:água (84:16).....	56
7.9. Teste do sistema de extração descrito por TANAKA (1985) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0) e eluição com acetonitrila:água (3:1).....	56
7.10. Teste do sistema de extração e limpeza descrito por ROSEN & ROSEN (1984).....	56
7.11. Teste do sistema de extração de SCOTT et al. (1981) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9).....	57
7.12. Teste do sistema de extração descrito por SCOTT et al. (1986) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9).....	57
7.13. Teste do sistema de extração descrito por FURLONG & SOARES (1995), partição com diclorometano e limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) (ROMER, 1986).....	57
8. Recuperação, repetibilidade, limites de detecção e de quantificação.....	58
9. Descontaminação do material.....	58
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
1. Escolha do melhor reagente de derivação e melhores condições de derivação.....	59
2. Avaliação de sistemas de extração e limpeza.....	62
2.1. Sistema de extração e limpeza de FURLONG & SOARES (1995).....	62
2.2. Sistema de extração de FURLONG & SOARES (1995) e limpeza em coluna de Florisil (2g).....	64
2.3. Sistema de extração descrito por FURLONG & SOARES (1995) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) (ROMER, 1986).....	67

2.4. Sistema de extração descrito por LANGSETH & CLASEN (1992) combinado com coluna de limpeza de alumina:carvão (2,3:1,9) (ROMER, 1986).....	68
2.5. Sistema de extração descrito por TANAKA (1985) combinado com coluna de limpeza de alumina:carvão (2,3:1,9) (ROMER, 1986).....	69
2.6. Sistema de extração e limpeza descrito por LAUREN & GREENHALGH (1987).....	71
2.7. Sistema de extração de LAUREN & GREENHALGH (1987) e limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0).....	76
2.8. Sistema de extração descrito por LANGSETH & CLASEN (1992) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0) e eluição acetonitrila:água (84:16).....	79
2.9. Sistema de extração descrito por TANAKA (1985) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0) e eluição com acetonitrila:água (3:1).....	81
2.10. Sistema de extração e limpeza descrito por ROSEN & ROSEN (1984).....	84
2.11. Sistema de extração, clarificação e partição de SCOTT et al. (1981) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9).....	85
2.12. Sistema de extração e clarificação do método de SCOTT et al. (1986) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9).....	87
2.13. Sistema de extração do método de FURLONG & SOARES (1995), com partição com diclorometano e limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9).....	88
3. Validação da metodologia escolhida.....	89
CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

<b>Capítulo 3: INCIDÊNCIA DE DESOXINIVALENOL, DIACETOXISCIRPENOL E TOXINA T2 EM CULTIVARES DE MILHO PIPOCA PLANTADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO E EM MILHO PIPOCA COMERCIALIZADO NA CIDADE CAMPINAS.....</b>	<b>97</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>99</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>101</b>
<b>1. Amostras.....</b>	<b>101</b>
<b>2. Delineamento experimental.....</b>	<b>103</b>
<b>3. Padrões de desoxinivalenol (DON), toxina T2 (T2) e diacetoxiscirpenol (DAS) e padrão interno (metil araquidato).....</b>	<b>103</b>
<b>4. Determinação de tricotecenos.....</b>	<b>104</b>
<b>5. Controle de qualidade analítico.....</b>	<b>105</b>
<b>6. Confirmação de identidade.....</b>	<b>106</b>
<b>6.1. Reação de acetilação.....</b>	<b>106</b>
<b>6.2. Reação de derivação com PFPI.....</b>	<b>106</b>
<b>7. Descontaminação do material.....</b>	<b>107</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>1. Controle de qualidade analítico.....</b>	<b>107</b>
<b>2. Incidência de tricotecenos.....</b>	<b>107</b>
<b>3. Confirmação de identidade.....</b>	<b>108</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>116</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>121</b>
<b>1- Reação de derivação com HFBI.....</b>	<b>123</b>
<b>2- Reação de derivação com TFAA/NaHCO<sub>3</sub>.....</b>	<b>124</b>
<b>3- Reação de derivação com TFAA/piridina.....</b>	<b>125</b>
<b>4- Método descrito por FURLONG &amp; SOARES (1995).....</b>	<b>126</b>

<b>5- Método descrito por LANGSETH &amp; CLASEN (1992) combinado com coluna de limpeza de alumina:carvão (ROMER, 1986).....</b>	<b>127</b>
<b>6- Método descrito por TANAKA (1985) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (ROMER, 1986).....</b>	<b>128</b>
<b>7- Método de extração e limpeza descrito por LAUREN &amp; GREENHALGH (1987).....</b>	<b>129</b>
<b>8- Método de extração e limpeza descrito por ROSEN &amp; ROSEN (1984).....</b>	<b>130</b>
<b>9- Sistema de extração descrito por SCOTT <i>et al.</i> (1981) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (ROMER, 1986).....</b>	<b>131</b>
<b>10- Sistema de extração descrito por SCOTT <i>et al.</i> (1986) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (ROMER, 1986).....</b>	<b>132</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1: Classificação dos principais tricotecenos (CROTEAU, 1994).....</b>	<b>13</b>
<b>Tabela 2: Ocorrência mundial dos tricotecenos.....</b>	<b>22</b>
<b>Tabela 3: Sistemas de eluição empregados nos testes com coluna de Florisol (2g).....</b>	<b>64</b>
<b>Tabela 4: Valores de recuperação (%) para DON, DAS e T2 das amostras controle.....</b>	<b>89</b>
<b>Tabela 5: Limites de detecção e quantificação do método.....</b>	<b>91</b>
<b>Tabela 6: Relação de cultivares de milho pipoca avaliadas nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Campinas, Mococa e Capão Bonito, Estado de São Paulo, safra 1998/99.....</b>	<b>102</b>
<b>Tabela 7: Área relativa e tempo de retenção relativo após reação de acetilação.....</b>	<b>110</b>
<b>Tabela 8: Área relativa e tempo de retenção relativo após derivação com PFPI.....</b>	<b>110</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Estrutura dos tricotecenos: a) grupos A e B; b) grupo C; c) grupo D.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 2: Perfil cromatográfico da derivação de padrão de DON com HFBI.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 3: Perfil cromatográfico da derivação de padrão de DON com TFAA/NaHCO<sub>3</sub>.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 4: Perfil cromatográfico da derivação de padrão de DON com TFAA/piridina.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 5: Perfil cromatográfico de uma mistura de DON, DAS e T2 derivados com TFAA/piridina.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 6: Perfil cromatográfico utilizando o sistema de extração e limpeza descrito por FURLONG &amp; SOARES (1995) em amostra de milho pipoca.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 7: Perfil cromatográfico do padrão de T2 eluído com clorofórmio:metanol (70:30) em coluna de Florisil (2g).....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 8: Perfil cromatográfico do padrão de T2 eluído com acetonitrila (100) em coluna de Florisil (2g).....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 9: Perfil cromatográfico do padrão de T2 eluído com acetonitrila:água (84:16) em coluna de Florisil (2g).....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 10: Perfil cromatográfico utilizando limpeza de extrato de milho pipoca em coluna de Florisil (2g) eluída com acetonitrila:água (84:16).....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 11: Perfil cromatográfico utilizando limpeza de extrato de milho pipoca em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) com acetonitrila:água (84:16) como eluente.....</b>	<b>67</b>

<b>Figura 12: Perfil cromatográfico utilizando o sistema de extração de LANGSETH &amp; CLASEN (1992), limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) e eluição com acetonitrila:água (84:16).....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 13: Perfil cromatográfico utilizando sistema de extração de TANAKA (1985), limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) e eluição com acetonitrila:água (84:16).....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 14: Amostra de milho pipoca contaminada artificialmente, limpa em coluna de 1g de alumina:carvão (20+1) e 2g de resina IRP-64.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 15: Amostra de milho pipoca contaminada artificialmente, limpa em coluna de 1g de alumina:carvão (20+1) e 2g de resina CG-50.....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 16: Amostra de milho pipoca contaminada artificialmente, limpa em coluna de 1g de alumina:carvão (20+1) e 2g de resina IR-120.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 17: Amostra de milho pipoca contaminada artificialmente com toxina T2 (1µg/g), limpa em coluna alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0) e eluída com acetonitrila:água (84:16).....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 18: Amostra de milho pipoca contaminada artificialmente com toxina T2 (1µg/g), limpa em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0) e eluída com acetonitrila:água (75:25).....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 19: Amostra contaminada artificialmente, desengordurada por Goldfish, extraída segundo o método de LANGSETH &amp; CLASEN (1992), limpa em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0) e eluída com acetonitrila:água (84:16).....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 20: Amostra não enriquecida, desengordurada por Goldfish, extraída segundo o método de TANAKA (1985), limpa em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0) e eluída com acetonitrila:água (3:1).....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 21: Amostra não enriquecida extraída e limpa segundo o método descrito por ROSEN &amp; ROSEN (1984).....</b>	<b>85</b>

<b>Figura 22: Amostra contaminada artificialmente extraída segundo o método descrito por SCOTT et al. (1981), passada por coluna de limpeza de alumina:carvão (2,3:1,9) e eluída com tolueno:acetona (95:5).....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 23: Amostra contaminada artificialmente extraída segundo o método descrito por SCOTT et al. (1986), passada por coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) e eluída com acetato de etila.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 24: Curva de calibração do Desoxinivalenol.....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 25: Curva de calibração da Toxina T2.....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 26: Curva de calibração do Diacetoxiscirpenol.....</b>	<b>91</b>
<b>Figura 27: Amostra de milho pipoca naturalmente contaminada com DON.....</b>	<b>108</b>
<b>Figura 28: Derivados do desoxinivalenol após reação de derivação com: (a) anidrido trifluoroacético; (b) anidrido acético; (c) pentafluoropropionilimidazol (PFPI).....</b>	<b>109</b>
<b>Figura 29: Perfil cromatográfico do padrão de DON acetilado.....</b>	<b>111</b>
<b>Figura 30: Perfil cromatográfico da amostra acetilada.....</b>	<b>112</b>
<b>Figura 31: Perfil cromatográfico da amostra enriquecida com DON e acetilada (DON<sub>acetilado</sub> + amostra<sub>acetilada</sub>).....</b>	<b>113</b>
<b>Figura 32: Perfil cromatográfico do padrão de DON derivado com PFPI.....</b>	<b>114</b>
<b>Figura 33: Perfil cromatográfico da amostra derivada com PFPI.....</b>	<b>115</b>
<b>Figura 34: Perfil cromatográfico da amostra enriquecida com DON e derivada com PFPI (DON<sub>PFPI</sub> + amostra<sub>PFPI</sub>).....</b>	<b>116</b>

## Resumo Geral

Os tricotecenos são metabólitos secundários produzidos por espécies de *Fusarium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium*, *Stachybotrys* e *Trichothecium*. Estas micotoxinas podem causar vômitos, angina necrótica, diarréia, anorexia, alterações hematológica, distúrbios neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragias generalizadas, seguidos ou não de morte. A doença que está associada a estes sintomas em humanos denomina-se Aleucia Tóxica Alimentar (ATA). Casos de ATA foram registrados em 1913 e após a Segunda Guerra Mundial em regiões da antiga União Soviética. A presença de tricotecenos em cereais tem sido relatada em várias partes do mundo. No Brasil, há uma grande deficiência de dados com relação à incidência destas toxinas em alimentos nacionais. Em parte, a razão para esta lacuna de informações está nas dificuldades técnicas que este tipo de análise envolve e na dificuldade de seu emprego em laboratórios nacionais.

O presente trabalho teve por objetivos: (a) avaliar reagentes de derivação para tricotecenos quando se emprega cromatografia gasosa com detector por ionização em chama, (b) avaliar sistemas de extração e limpeza de extratos de milho pipoca para determinação de tricotecenos e (c) realizar um levantamento de incidência de alguns tricotecenos, desoxinivalenol (DON), diacetoxiscirpenol (DAS) e toxina T2 (T2), em cultivares comerciais de milho pipoca plantados em três regiões do Estado de São Paulo e em milho pipoca oferecido à população em estabelecimentos comerciais na cidade de Campinas, SP.

Vários sistemas de extração e limpeza foram testados e o método de extração e limpeza descrito por FURLONG & SOARES (1995), combinado com a coluna de limpeza de ROMER (1986), foi considerado o mais adequado para proceder à determinação de tricotecenos em milho para pipoca. A extração foi realizada com metanol:cloreto de potássio 4% (9:1) seguida de limpeza por clarificação com sulfato de amônio 30% e partição com diclorometano. A seguir, o extrato foi passado pela coluna de alumina:carvão (2,3 : 1,9) com acetonitrila:água

(84:16) como eluente. O reagente de derivação empregado foi o anidrido trifluoroacético (TFAA) em piridina antes da cromatografia a gás com detector por ionização em chama. As recuperações médias obtidas foram 72% para DON, 88% para DAS e 87% para T2. Os limites de detecção encontrados foram 30 ng/g para o DON, 50 ng/g para o DAS e 40 ng/g para a T2. Os coeficientes de variação médios para amostras artificialmente contaminadas, no nível de 500 ng/g, foram 9,8, 6,3 e 6,6 % para DON, DAS e T2, respectivamente.

A incidência dos tricotecenos DON, DAS e T2 foi avaliada em 90 amostras de milho pipoca, pertencentes a 30 cultivares experimentais, plantadas nas estações experimentais de Campinas, Mococa e Capão Bonito, do Instituto Agrônomo de Campinas, no Estado de São Paulo, e em 15 amostras de milho pipoca (9 pertencentes a marcas comerciais e 6 à granel) adquiridas de estabelecimentos comerciais da cidade de Campinas. Dentre as cento e cinco amostras analisadas, cinco estavam contaminadas com desoxinivalenol (DON). Destas cinco amostras contaminadas, quatro eram amostras comerciais e o nível de contaminação variou entre 30 e 40 ng/g DON. Uma amostra proveniente dos campos experimentais estava contaminada com 770 ng/g de DON. Os tricotecenos DAS e T2 não foram detectados em nenhuma das amostras. Os resultados do levantamento indicam que não há risco para a população no consumo de milho pipoca com relação a estes tricotecenos devido a baixa incidência e teores encontrados.

## General Summary

Trichothecenes are secondary metabolites produced by species of *Fusarium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium*, *Stachybotrys* and *Trichotecium*. These toxins can cause vomit, necrotic angina, diarrhea, anorexia, hematological alterations, neurological problems, destruction of the bone marrow and generalized hemorrhages, followed sometimes by death. The disease associated with these symptoms in humans is called Alimentary Toxic Aleutia (ATA). ATA cases were registered in 1913 and after the Second World War, in areas of the old Soviet Union. The presence of trichothecenes in cereals has been reported in several parts of the world. In Brazil there a great lack of data in relation to the incidence of these toxins in national foods. In part, a reason for this lack of information resides in the technical difficulties involved in this type of analysis and in the difficulties associated with its use in national laboratories.

The present work had the following objectives: (a) evaluate derivatization reagents for trichothecenes when gas chromatography with flame ionization detection is employed, (b) evaluate extraction and cleanup systems for popcorn extracts being analyzed for trichothecenes, and (c) conduct a survey on the incidence of some trichothecenes, deoxynivalenol (DON), diacetoxyscirpenol (DAS), and toxin T-2 (T2), in samples of commercial popcorn cultivars planted at three areas of the state of São Paulo and in popcorn sold at shops in the city of Campinas, SP.

Several extraction and cleanup systems for trichothecenes were tested. The extraction and cleanup method described by FURLONG and SOARES (1995), combined with the ROMER (1986) cleanup column was found the most adequate for trichothecenes determination in popcorn. The extraction was performed with methanol:4% potassium chloride (9:1) and followed by clarification with 30% ammonium sulfate and partition to dichloromethane. The extract was then passed through an alumina:carbon (2.3:1.9) column and eluted by acetonitrile:water (84:16). Trifluoroacetic anhydride in pyridine was employed as derivatization reagent prior to gas chromatography with flame ionization detector.

The average recoveries were 72% for DON, 88% for DAS and 87% for T2. The detection limits were 30 ng/g, 50 ng/g, and 40 ng/g for DON, DAS, and T2, respectively. The average RSDs, for artificially contaminated samples at the 500 ng/g level, were 9.8, 6.3, and 6.6 % for DON, DAS, and T2, respectively.

The incidence of the trichothecenes DON, DAS, and T2 was evaluated in 90 samples of popcorn, belonging to 30 experimental cultivars and planted at the experimental stations of Campinas, Mococa and Capão Bonito, of the Agronomic Institute of Campinas, in the state of São Paulo. Fifteen samples of popcorn (9 branded and 6 unbranded) were acquired at food shops in the city of Campinas, state of São Paulo, and were also analyzed for the same trichothecenes. Among the 105 samples analyzed 5 were found contaminated with DON. Four of the contaminated samples were commercial popcorn and the levels found ranged from 30 to 40 ng/g DON. One sample from the experimental stations was also contaminated with 770 ng/g DON. No DAS or T2 were detected in the samples. The results of the survey indicate that there is no risk for the popcorn consuming population with respect to the trichothecenes searched due to the low incidence and levels found.

## Introdução Geral

Os tricotecenos são produzidos por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium*, *Stachybotrys* e *Trichothecium*, de onde o nome é derivado. Um total de 148 tricotecenos são conhecidos, sendo 83 não-macrocíclicos e 65 macrocíclicos. Apenas alguns tricotecenos são de ocorrência natural como, por exemplo, o desoxinivalenol (DON), o nivalenol (NIV), a toxina T2 (T2), a toxina HT2 (HT2) e o diacetoxiscirpenol (DAS).

Os sintomas característicos dos efeitos tóxicos dos tricotecenos em humanos e animais são vômitos, angina necrótica, diarreia, anorexia, alterações hematológicas, distúrbios neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragias generalizadas, seguidos ou não de morte. A doença que está associada a estes sintomas chama-se Aleucia Tóxica Alimentar (ATA). Casos fatais desta doença ocorreram em 1913 e após a Segunda Guerra Mundial em regiões da antiga Rússia.

Cereais contaminados por diversas espécies de *Fusarium* são a possível fonte de tricotecenos em alimentos destinados ao consumo humano e de animais. Dentre os vários cereais, o trigo e o milho parecem ser os mais susceptíveis a contaminação. O DON tem sido o tricoteceno mais frequentemente encontrado nos cereais.

No Brasil não há dados sobre a incidência de tricotecenos em milho. Apenas um levantamento em 50 amostras de milho foi realizado na década de 80 utilizando cromatografia em camada delgada. Dentre os tipos de milho produzidos no País, o milho para pipoca apresenta interesse especial devido à preferência infantil por este sob a forma de "snack".

Por estarem, os tricotecenos, presentes em traços nos alimentos destinados ao consumo humano e rações animais, métodos analíticos sensíveis e específicos tornam-se necessários. A cromatografia gasosa (CG), devido à sua versatilidade, tem sido a técnica mais empregada na determinação de tricotecenos em diversos tipos de amostras, com detecção por captura de elétrons (CE), espectrômetro de massas (EM) ou por ionização em chama (IC).

A versatilidade da CG facilita o desenvolvimento de métodos para análises de rotina para amostras contendo vários tricotecenos. A análise de tricotecenos por CG inclui etapas de extração, limpeza, e na maioria dos casos, uma reação de derivação compatível com o sistema de detecção utilizado.

Em virtude da falta de uma metodologia para a determinação de DON, T2 e DAS em milho pipoca adaptado à realidade dos laboratórios nacionais, este trabalho teve como objetivos: a) avaliar qual o melhor agente derivador para estes tricotecenos quando se emprega detector por ionização em chama; b) avaliar qual o melhor sistema de extração e limpeza de extratos de milho pipoca e c) realizar um levantamento de incidência de tricotecenos em cultivares de milho pipoca plantados em três regiões do Estado de São Paulo e milho pipoca oferecido à população.

## Capítulo 1

---

### Revisão Bibliográfica

## Resumo

---

Os tricotecenos são metabólitos secundários produzidos por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* e *Stachybotrys*. Os fungos produtores de tricotecenos são conhecidos como patógenos de plantas produtoras de cereais, os quais são utilizados na alimentação humana e animal. Esta família de micotoxinas caracteriza-se por possuir um esqueleto tetracíclico 12,13 epoxi-tricotec-9-eno com funções éster e álcool residindo na periferia da molécula. Atualmente, são conhecidos mais de 140 tricotecenos, mas menos que 10 compostos são de ocorrência natural. Alguns dos sintomas dos efeitos tóxicos causados pelos tricotecenos são vômito, diarreia, destruição da medula óssea, hemorragia generalizada, seguidos ou não de morte. Estes sintomas são observados tanto no homem como em animais intoxicados. A contaminação de cereais, principalmente milho, trigo e seus produtos processados com tricotecenos ocorre no mundo inteiro e é reportada em diversos trabalhos. No Brasil, apenas alguns trabalhos trazem dados sobre a incidência destas micotoxinas em produtos nacionais. Os tricotecenos são compostos que estão presentes em traços (ng/g) nos alimentos destinados ao consumo humano e animal, por isso métodos analíticos sensíveis e específicos devem ser utilizados em sua determinação. Métodos espectroscópicos, cromatográficos e imunoensaios vêm sendo utilizados na determinação destas micotoxinas. Dentre os métodos analíticos, a cromatografia gasosa é a técnica mais utilizada na separação e quantificação de tricotecenos. A presente revisão tem como objetivo reunir informações sobre as características químicas, os efeitos tóxicos e a incidência de tricotecenos, assim como rever os métodos analíticos mais importantes empregados na determinação destas micotoxinas em cereais.

---

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. A Cultura de Milho no Brasil

O milho há alguns séculos vem sendo utilizado diretamente na alimentação humana e de animais domésticos e, sua importância não se restringe apenas ao fato do grande volume mundial produzido, mas também ao seu importante papel sócio-econômico. Constitui ainda inestimável fonte de matéria prima básica para expressiva série de produtos industrializados, movimentando grandes complexos industriais onde milhares de empregos são criados. Devido ao seu alto conteúdo de carboidratos, principalmente amido, e de outros componentes tais como proteínas, lipídios e vitaminas, torna-se um produto de relevante importância comercial (FANULLI & LIMA, 1982).

Cotado como o terceiro maior produtor mundial de milho, ficando atrás somente dos Estados Unidos e da China, o Brasil já foi exportador do produto. Atualmente, a produção nacional rende 2,6 toneladas por hectare, enquanto que a produção mundial alcança a marca de 6,5. Mas o desempenho nacional nesse campo pode atingir patamares mais ousados. Esta esperança vem de pesquisas realizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), que revela um potencial do país para produzir mais 40 milhões de toneladas anuais de milho na mesma área cultivável (ABIMILHO, 2000).

Devido à fácil adaptação, o milho é atualmente cultivado na maior parte do território nacional, seu plantio melhor distribuído e tecnicamente preparado nos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e Goiás (ABIMILHO, 2000).

O grão de milho é constituído basicamente de carboidratos (60%), proteína (10%) e lipídios (4%). O endosperma é praticamente constituído de

carboidratos, ao passo que o embrião (ou germe) concentra a maior porcentagem de lipídios, proteínas e sais minerais, presentes no grão, que, ainda pode conter significativas quantidades de ácido nicotínico, riboflavina, ácido pantotênico e vitamina E (FANULLI & LIMA, 1982). Tal composição faz com que este cereal seja utilizado no preparo de mais de 500 derivados (NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 1987). Ainda, devido seu elevado valor energético, o grão de milho é largamente empregado na alimentação de animais, principalmente na forma de rações, onde aparece como componente principal (FANULLI & LIMA, 1982).

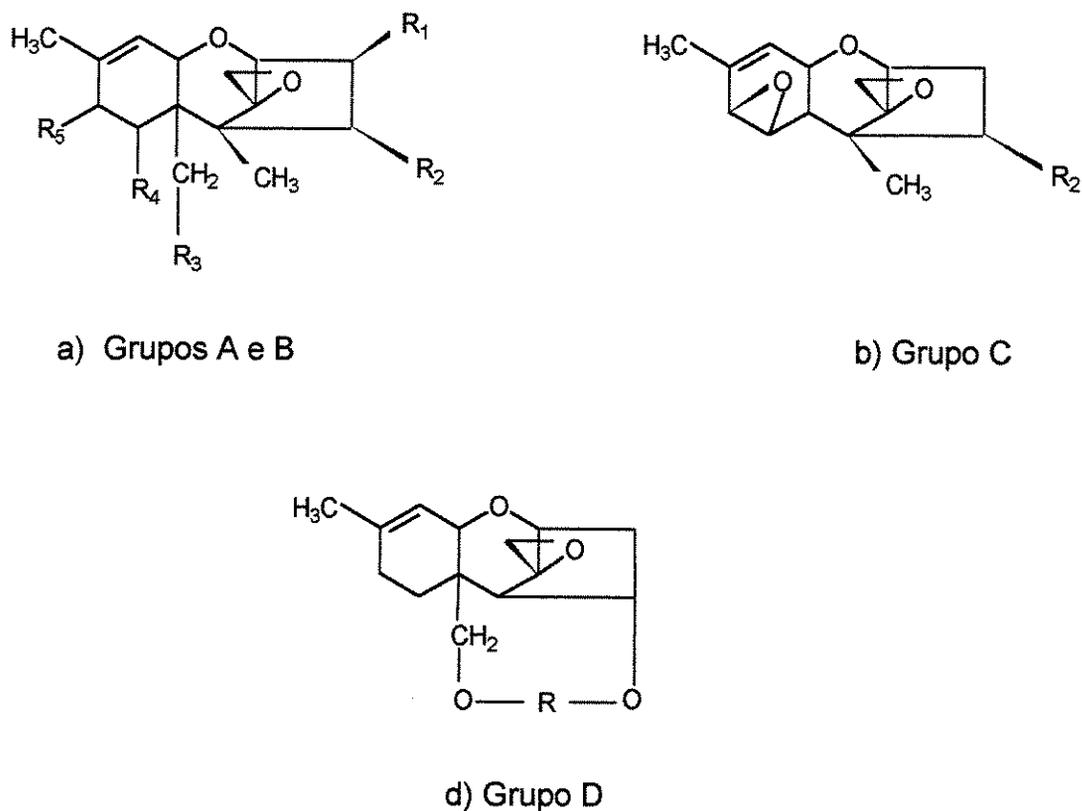
As cinco classes de milho - o milho duro, a pipoca, o dentado, o doce e o farináceo – são baseadas nas características das sementes (grãos). O milho duro possui uma coroa circular e a dureza do grão é atribuída ao grande e contínuo volume de endosperma. As variedades do milho duro são populares na Argentina, em algumas partes da Itália e África. O milho pipoca é um tipo especial de milho duro. O milho farináceo geralmente possui uma coroa circular ou plana (achatada) e um endosperma farináceo ou mole. O milho dentado apresenta uma “depressão” na coroa quando o grão maduro está seco (WATSON & RAMSTAD, 1987).

## **2. Tricotecenos**

### **2.1. Estrutura química e estabilidade**

As micotoxinas tricotecenos são um grupo de metabólitos fúngicos caracterizados por um esqueleto tetracíclico 12,13-epoxi-tricotec-9-eno. Estas micotoxinas constituem uma família de sesquiterpenóides com funções éster e álcool nas porções externas da molécula. Possuem uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 e um grupo epóxido nos carbonos 12 e 13. Os tricotecenos são produzidos por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* e *Stachybotrys* (Ueno, 1983). Atualmente

são conhecidos 148 tricotecenos, onde 83 são os não-macrocíclicos e 65 macrocíclicos. Alguns deles são de ocorrência natural como o desoxinivalenol, o nivalenol, a toxina T2, o diacetoxiscirpenol e a toxina HT2 (KOTAL *et al.*, 1999). A estrutura química básica dos tricotecenos está representada na figura 1.



**Figura 1: Estrutura dos tricotecenos: a) grupos A e B; b) grupo C; c) grupo D.**

Substituintes como hidrogênio, hidroxila, acila, epóxido ou éster podem estar presentes nos carbonos 3 ( $R_1$ ), 4 ( $R_2$ ), 15 ( $R_3$ ), 7 ( $R_4$ ), e 8 ( $R_5$ ). Considerando seus substituintes e suas características químicas, existe uma classificação dos tricotecenos em quatro grupos: tipos A, B, C e D, como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Classificação dos principais tricotecenos (CROTEAU, 1994)

Composto	R <sub>1</sub> <sup>a</sup>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>Grupo A</b>					
Verrucarol (VER)	-H	-OH	-OH	-H	-H
Scirpentriol (SCT)	-OH	-OH	-OH	-H	-H
Diacetoxiscirpenol (DAS)	-OH	-Oac <sup>b</sup>	-Oac	-H	-H
T-2 tetrol (T24)	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Toxina HT-2 (HT-2)	-OH	-OH	-Oac	-H	-O-ival <sup>c</sup>
Toxina T-2 (T-2)	-OH	-Oac	-Oac	-H	-O-ival <sup>c</sup>
<b>Grupo B</b>					
Nivalenol (NIV)	-OH	-OH	-OH	-OH	=O
Fusarenona-X (F-X)	-OH	-OAc	-OH	-OH	=O
Desoxinivalenol (DON)	-OH	-H	-OH	-OH	=O
3-acetil- DON (3AD)	-Oac	-H	-OH	-OH	=O
15-acetil- DON (ADON)	-OH	-H	O-ac	-OH	=O
<b>Grupo C</b>					
Crotocol		R <sub>2</sub> = -OH			
Crotocina (CRO)		R <sub>2</sub> = -OCOCH=CHCH <sub>3</sub>			
<b>Grupo D</b>					
Verrucarina A (VER A)		$R = \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{CCHOHCHMeCH}_2\text{CH}_2\text{OCCH}=\text{CHCH}=\text{CHC} \text{---}$			
Roridina A (ROR A)		$R = \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{CCHOHCHMeCH}_2\text{CH}_2\text{OCCH}=\text{CHCH}=\text{CHC} \text{---}$ <div style="text-align: center; margin-left: 100px;"> <math>\downarrow</math>              MeCHOH         </div>			

<sup>a</sup> O sobrescrito denota a posição de ligação no núcleo do tricoteceno. <sup>b</sup> Ac, -COCH<sub>3</sub> (acetil). <sup>c</sup> ival, -COCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (isovaleril).

No grupo A estão os tricotecenos cujas posições R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> têm como substituintes grupos acilados ou hidroxilas, como a toxina T-2 e o diacetoxiscirpenol. O grupo B é constituído por compostos onde a posição R<sub>5</sub> está ocupada com um grupo cetônico, assim como o nivalenol e o desoxinivalenol. Os

tricotecenos pertencentes ao grupo C possuem dois grupamentos epóxidos, como a crotocina. Tricotecenos macrocíclicos pertencem ao grupo D, onde apresentam um sistema de anel, como a roridina, a verrucarina e a satratoxina (UENO, 1986).

Os tricotecenos são compostos incolores, cristalinos, sólidos opticamente ativos, solúveis em álcool, acetona, clorofórmio e acetato de etila, mas são pouco solúveis em água. Todos os tricotecenos com grupo éster são hidrolizados ao álcool correspondente quando tratados com base. Tricotecenos com maior número de hidroxilas como nivalenol, desoxinivalenol e a toxina T-2 tetraol são pouco solúveis nos solventes citados acima, mas são solúveis em solventes mais polares como metanol e água. Portanto, os tricotecenos diferem muito entre si quanto à solubilidade em solventes orgânicos. Estes compostos são estáveis, por muitos anos, quando estocados à temperatura ambiente e podem ser aquecidos a 100°C por uma hora sem sofrerem degradação. As variações em suas propriedades físico-químicas tornam complexa a detecção destes compostos (UENO, 1986; SNYDER, 1986).

## **2.2. Microrganismos Produtores**

Grande parte dos grãos de cereais são expostos a uma ampla variedade de organismos provenientes da poeira, água, plantas doentes, insetos, solo, fertilizantes e material orgânico de animais. Entretanto, o número e os tipos de microrganismos encontrados nos grãos vão depender da resistência dos mesmos, bem como do tipo de solo, insetos, roedores e especialmente das condições climáticas durante e imediatamente após a colheita (SILLIKER & ELLIOTT, 1980). A superfície externa dos grãos, na colheita, contém centenas de espécies microbianas, porém somente algumas são capazes de invadir o grão e promover a sua deterioração (SEMENIUK, 1954)

A contaminação fúngica parece ser a causa mais freqüente da inevitável perda de qualidade de grãos e sementes. Esta contaminação pode fazer com que os grãos tornem-se impróprios para o consumo, resultando em grandes perdas econômicas (PASTER & BULLERMAN, 1988). Os fungos podem causar uma série de danos aos grãos durante o plantio e a colheita, bem como durante o armazenamento (SILLIKER & ELLIOTT, 1980). Os efeitos da invasão fúngica incluem a diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, cozimento, mudanças químicas e nutricionais, perda de qualidade e produção de micotoxinas (POMERANZ, 1982).

Os tricotecenos são produzidos por várias espécies de fungos, principalmente as do gênero *Fusarium*, como também pelas espécies de *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Stachybotrys* e *Verticimonosporium*. Os fungos produtores de tricotecenos são conhecidos como patógenos de plantas produtoras de cereais, os quais são utilizados na alimentação humana e de animais. Estes bolores causam toxicoses tanto no homem como nos animais (UENO, 1983).

Segundo FLANNIGAN (1991) (citado por PLACINTA *et al.* 1999), espécies de *Fusarium* sintetizam uma grande variedade de micotoxinas de estrutura e propriedades químicas bastante diferentes. Estes fungos causam doenças nos grãos, no talo e nas espigas de milho. As espécies freqüentemente isoladas de regiões de clima temperado são *Fusarium graminearum* Schwabe (*Gibberella zeae* Petch) e *Fusarium moniliforme* Heldon (*Gibberella fugikuroi* [Sawada] Wollenw), seguidos pelo *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saac., *Fusarium subglutinans* (Wollenw & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas, *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nierenberg e *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. *Sensu* Gordon (SOHN *et al.* 1999). A injúria causada por algumas espécies de *Fusarium*, tais como *F. graminearum*, é caracterizada por pelo aparecimento de coloração rosada nos grãos (PLACINTA *et al.*, 1999).

A capacidade de sintetizar tricotecenos do tipo A ou do tipo B é característica da espécie *Fusarium*. Por exemplo, a produção de tricotecenos do grupo A predomina em *F. sporotrichoide* e possivelmente em *F. poae*, enquanto a síntese de tricotecenos do grupo B ocorre principalmente em *F. culmorum* e *F. graminearum*. O *Fusarium graminearum* produz tricotecenos como o DON, 15-ADON, NIV e 4-ANIV (ou fusarenona X), assim como uma micotoxina estrogênica, a zearalenona. Em adição, dentro das espécies as características variam em termos de produção de tipos específicos de tricotecenos. PERKOWSKI *et al.* (1997) identificaram dois tipos químicos de *Fusarium graminearum*, um produzindo NIV e DON e outro elaborando uma mistura de DON e ambos derivados acetilados (exemplos: 3-ADON e 4-ANIV) (PLACINTA *et al.*, 1999). Uma característica comum a muitas espécies de *Fusarium* é sua habilidade em sintetizar zearalenona, e sua co-ocorrência com certos tricotecenos (PLACINTA *et al.*, 1999). *Fusarium acuminatum*, por sua vez, produz somente toxina T2 tetraol e neosolaniol (JIMÉNEZ & MATEO, 1997). Espécies de *Fusarium* têm sido isoladas à partir de derivados de milho (MARASAS & SMALLEY, 1972) e de outros cereais assim como arroz, sorgo, cana-de-açúcar, feno (CLEVSTROM, 1986) e substratos diversos (THIEL *et al.*, 1991). Também ocorrem em frutas como a banana (JIMÉNEZ & MATEO, 1997). O milho é melhor substrato que o arroz para a produção de micotoxinas do *Fusarium graminearum* como DON, 15-ADON e ZEA (PLACINTA *et al.*, 1999).

### 2.3. Efeitos tóxicos

Sintomas característicos dos efeitos tóxicos dos tricotecenos em humanos são vômitos, angina necrótica, diarreia, anorexia, alterações hematológicas, distúrbios neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragias generalizadas, seguidos ou não de morte. Os mesmos sintomas podem ser observados em animais intoxicados (SCOTT *et al.*, 1981; SNYDER, 1986; UENO, 1986).

Fusariotoxicose em humanos com casos fatais ocorreram em 1913 na antiga Rússia nas regiões da Sibéria e de Amur. Após a Segunda Guerra Mundial, outros casos foram registrados. A população atingida havia consumido alimentos produzidos a partir de grãos que não puderam ser colhidos durante o inverno. Os sintomas da doença, denominada Aleucia Tóxica Alimentar (ATA), foram os mesmos citados anteriormente (OSBORNE, 1982; UENO, 1983; SNYDER, 1986; JACOBSEN *et al.*, 1993).

Os efeitos mais estudados dos tricotecenos são os dérmicos, os eméticos e os no sistema sangüíneo. GRANDONI e colaboradores (1990), demonstraram que no sistema sangüíneo, as plaquetas também têm sua função inibida pela presença de tricotecenos, como a toxina T-2, o diacetoxiscirpenol e a toxina HT-2. Esta atividade parece apresentar uma correlação positiva com o caráter lipofílico da toxina. Sabe-se que DON, NIV e toxina T2 induzem apoptose em células HL-60 (TANAKA *et al.*, 2000).

A diversidade de sintomas observados indica que tricotecenos são inibidores da síntese de proteínas, da síntese de DNA e RNA e têm efeitos imunossupressivos e hemorrágicos. As intoxicações aguda e subaguda são caracterizadas pela recusa alimentar, perda de peso e susceptibilidade à doenças infecciosas. A toxina T-2 e outros tricotecenos do grupo A são dez vezes mais tóxicos que o desoxinivalenol. Há indicações que os suínos são a espécie animal mais sensível, enquanto que os tricotecenos são detoxificados nos ruminantes. As aves mostram-se relativamente tolerantes. Os tricotecenos são rapidamente distribuídos e metabolizados após o consumo por suínos e não há evidências de acúmulo nos tecidos e fluídos sangüíneos (KIESSELING, 1986; SHEPHERD & GILBERT, 1988; SNYDER, 1986; UENO, 1986; PRELUSCKY & TRENHOLM, 1991; LANGSETH & RUNDBERGET, 1998).

A inibição da síntese protéica é conseqüência da ligação do grupo epóxido dos tricotecenos com o grupamento -SH dos aminoácidos que compõem

a peptidil transferase, mas outras enzimas do mesmo processo de síntese podem ser alteradas por este mecanismo. As células de função imunológica parecem ser mais sensíveis a esta inibição que as demais células do organismo (UENO, 1977; SHEPHERD & GILBERT, 1988; SNYDER, 1986; UENO, 1986).

A toxicidade dos tricotecenos depende da presença do anel epóxido nos carbonos 12 e 13 e da dupla ligação entre os carbonos 9 e 10. Cada tricoteceno, em particular, também tem sua atividade determinada pelo número e posição de hidroxilas e ésteres nas demais posições (KIESSELING, 1986; UENO, 1986).

A toxicidade dos tricotecenos não-macrocíclicos varia entre o desoxinivalenol, o menos tóxico, e a toxina T-2 que é a mais tóxica para a maioria dos animais testados. Níveis na faixa de 0,05 a 10 µg/kg de peso corpóreo (p.c.) são necessários para serem observados efeitos dérmicos provocados pelos diferentes tricotecenos. Efeitos eméticos são observados quando doses de 0,1 a 13,5 ng/kg de p.c. são administradas. As doses letais variam em torno de 1 a 700 mg/kg de p.c. (SHEPHERD & GILBERT, 1988; SNYDER, 1986; UENO, 1986).

Os tricotecenos, ao serem metabolizados no organismo animal, podem sofrer reações de hidrólise, hidroxilação, abertura de anel epóxido e conjugação, resultando em compostos de toxicidade pouco conhecida. A importância de cada reação varia para cada espécie animal, justificando as diferentes manifestações observadas quando da ingestão das toxinas (UENO, 1983; 1986).

Muitas toxinas de *Fusarium* podem co-ocorrer em determinados alimentos. Em geral, combinações de micotoxinas de *Fusarium* resultam em aditividade de efeitos, mas o sinergismo ou a potenciação de interações têm sido observadas e são de grande interesse para a saúde e produtividade de animais. Alguns efeitos sinérgicos entre DON e ácido fusárico; DON e fumonisina B<sub>1</sub> e DAS

e aflatoxinas, vêm sendo bastante relatados. Há poucas evidências da potenciação entre FB<sub>1</sub> e DON ou toxina T2 (D'MELLO *et al.*, 1999).

De acordo com KOLLARCZIK *et al.* (1994) (citado por D'Mello *et al.*, 1999), a transformação microbiana do DON no intestino dos animais é bastante conhecida e bem documentada. Uma recente investigação tentou elucidar qual era o local de maior atividade, em porcos, assim como a natureza e a toxicidade relativa dos metabólitos formados. Utilizando um sistema *in vitro* foi determinado que, como de esperado, a transformação microbiana do DON foi maior no ceco, cólon e reto. O único metabólito detectado foi o de-epoxi-DON, um produto formado no intestino grosso de outros animais inclusive em bovinos. Além disso, foi mostrado que a transformação do DON foi acompanhada por uma significativa perda na citotoxicidade para as células do fígado de porcos (D'MELLO *et al.*, 1999).

O nivalenol (NIV), a toxina T2 (T2) e o diacetoxiscirpenol (DAS) induzem lesões orais e na moela de aves. No caso do DAS, as lesões são relacionadas diretamente à duração da exposição a micotoxina e a concentração da toxina na dieta (D'MELLO *et al.*, 1999). Uma alimentação com alto teor de gordura para frangos aumenta o crescimento da depressão (lesão) causada pelo DAS, sugerindo que a dieta facilita a absorção micelar da toxina que é então capaz de inibir a síntese protéica a nível ribossômial. A toxina T2 induz lesões em porcos, especialmente na mucosa da região do esôfago. Além disso, a toxina T2 pode causar dermatite no focinho, no nariz e na boca dos porcos (D'MELLO *et al.*, 1999). Estudos anteriores com porcos indicavam que DON era um potente inibidor da ingestão (anorexia) de alimentos e fator emético. Porém, estudos mais recentes têm confirmado somente o efeito anoréxico. A inibição da ingestão de alimentos, em termos quantitativos, tem sido observada principalmente na faixa de 6-15 mg DON/kg. Em níveis superiores a 15 mg/kg, a ingestão de alimento foi apenas 0,38 do valor controle. Mesmo em níveis maiores de DON, emese não foi observada (D'MELLO *et al.*, 1999).

LEESON *et al.* (1995) (citado por PLACINTA *et al.*, 1999) listam valores de LD<sub>50</sub>, determinadas em aves jovens, de 2,0 a 5,9 mg/kg de peso corpóreo (p.c) para DAS e 3,60 a 5,25 mg/kg p.c. para a toxina T2. Em contraste, um valor de LD<sub>50</sub> de 140mg/kg p.c para DON.

HARVEY *et al.* (1995) (citado por PLACINTA *et al.*, 1999) observaram que a combinação de aflatoxina com DAS causava uma depressão sinérgica no crescimento de ovelhas e aumentava no soro a atividade de  $\gamma$ -glutametiltransferase.

A utilização dos tricotecenos em armas biológicas foi um fato que despertou interesse em muitos pesquisadores. Acredita-se que estas micotoxinas faziam parte da "Yellow Rain", uma arma química utilizada no Sudeste Asiático a partir de 1975 (ROSEN & ROSEN, 1984).

### **3. Incidência dos Tricotecenos**

#### **3.1. Mundial**

A ocorrência de tricotecenos em milho, cevada, aveia, trigo, centeio, sorgo, amendoim, silagem, feno, rações e em produtos processados tem sido descrita (SCOTT, 1997). Alguns dos casos mais significativos de contaminação em milho e em outros cereais são citados na Tabela 2.

Um monitoramento para desoxinivalenol (DON) em grãos e alimentos no Canadá pelo "Health Protection Branch" tem sido realizado todos os anos desde 1980, quando este foi encontrado pela primeira vez em "soft wheat" (colheitas de 1979 e 1980). A incidência de DON neste tipo de trigo tem variado, através dos anos, 22 a 100%. O limite aceitável de desoxinivalenol é 2 ng/g em "soft wheat" não-limpo pela regulamentação canadense (SCOTT, 1997). Foi

observado naquele país, mais especificamente em Ontário, uma incidência de tricotecenos em milho de 13 a 100% das amostras, com médias anuais de 0,16 a 1,4 ng/g (SCOTT, 1997). Outros tricotecenos como o nivalenol e a toxina HT-2, também vêm sendo encontrados, mas com frequência menor, nos grãos canadenses (SCOTT, 1997).

O "Food and Drug Administration", dos Estados Unidos, propõe 1mg/kg de DON como limite máximo em farelo, farinha e germe para consumo humano e 4mg/kg para ingredientes de rações. A Noruega e a Suécia permitem no máximo 400 e 500µg/kg de DON, respectivamente, em rações para porcos. Os métodos de controle de qualidade devem ser capazes de determinar tricotecenos abaixo de 100-500µg/kg em amostras naturalmente contaminadas. (LANGSETH & RUNDBERGT, 1998).

O DON tem sido o tricoteceno mais encontrado nos Estados Unidos seguido pelo NIV, as toxinas T2 e HT2 e o DAS. O trigo, o milho e a cevada utilizados para o consumo humano e de animais estão, em alguns países, frequentemente contaminados com tricotecenos. Estudos realizados nos Estados Unidos, Alemanha, Holanda, Bulgária, Hungria, Rússia, China, Coreia e Argentina têm mostrado que 60-100% das amostras estão contaminadas com DON em até 44µg/g (CAHIL *et al.*, 1999).

Níveis potencialmente nocivos de DON atingindo até 40 mg/kg foram observados no trigo produzido na Alemanha, na Polônia, no Japão, na Nova Zelândia, no Canadá e na Argentina. Em amostras de grãos de cevada da Noruega, do Japão e dos Estados Unidos foi encontrado DON em níveis acima de 71 mg/kg. Um estudo norueguês, com amostras de aveia, encontrou amostras com DON na faixa de 7 a 72 mg/kg de grão (PLACINTA *et al.*, 1999).

Tabela 2: Ocorrência mundial dos tricotecenos

Micotoxina	Amostra	Localidade	Referência
T-2, DAS	Milho e rações a base de milho	Saint Louis (MO)	Romer <i>et al.</i> , 1978
DON	Milho	Transkei (África do Sul)	Marasas <i>et al.</i> , 1981
DON	Trigo, milho	Ontário e Quebec (Canadá)	Sutton, 1982
DON	Trigo	Leste e norte central de Kansas; leste de Nebraska	Shotwell <i>et al.</i> , 1985
DON, NIV	Sorgo, mel, pólen, folhas de arroz, "mung beans"	Reino Unido	Black <i>et al.</i> , 1987
DON, NIV	Trigo, milho	Canadá e Nova Zelândia	Lauren & Greenhalgh 1987
DON, NIV, T-2, HT-2, 3-ac-DON	Centeio, trigo, aveia, glúten de milho, soja, rações animais	Finlândia	Hietaniemi & Kumpulainen, 1991
DON, T-2, NIV	Cevada, arroz, milho, "millet", "Indian millet"	Coréia	Park <i>et al.</i> , 1991
DON, NIV, 4-ac-NIV, 15-ac-DON, 4,15-diac-NIV, 3-ac-DON	Milho	Províncias da Coréia	Kim <i>et al.</i> , 1993
DON	Cerveja	Canadá	Scott <i>et al.</i> , 1993
DON, NIV	Trigo	Japão	Sugiura <i>et al.</i> , 1993
T-2, HT-2, MAS, Iso-NEO	Milho	Cixian e Lixian (China)	Chu & Li, 1994
Tipo A, DON	Milho	Wiscosin	Park <i>et al.</i> , 1996
DON, NIV	Cevada, milho	Províncias da Coréia	Ryu <i>et al.</i> , 1996
DON	Trigo	Argentina	Pacin <i>et al.</i> , 1997
DON	Trigo	EUA	Cahil <i>et al.</i> , 1999
Tipos A e B	Cereais	Japão	Tanaka <i>et al.</i> , 2000

### 3.2. Nacional

Pouco se conhece sobre a incidência de tricotecenos em alimentos nacionais. A ocorrência de desoxinivalenol foi investigada por SABINO *et al.* (1989) em 50 amostras de milho e 70 de trigo e seus derivados (farinha, farelo, etc) adquiridas nos centros comerciais da cidade de São Paulo ou enviadas para o Instituto Adolfo Lutz quando suspeitas de intoxicação animal. Utilizaram cromatografia em camada delgada, única técnica disponível no Brasil na época e de baixa sensibilidade para este tipo de análise. Somente 2 amostras de farinha de trigo e de ração animal estavam contaminadas com 183 µg/kg. FURLONG *et al.* (1995c) analisaram trigo proveniente de estações experimentais do Estado de São Paulo, por meio de cromatografia à gás e encontraram 6 amostras contaminadas, dentre as 20 objeto do levantamento. Em ordem decrescente de frequência foram encontrados desoxinivalenol (4 amostras, 470 - 590 ng/g), nivalenol (3 amostras, 160 - 400 ng/g), toxina T-2 (2 amostras, 400 - 800 ng/g), diacetoxiscirpenol (1 amostra, 600 ng/g). Ainda FURLONG *et al.* (1995b), encontraram 4 amostras contaminadas dentre 18 amostras de trigo armazenado no Estado do Rio Grande do Sul .

### 4. Metodologia Analítica para Determinação de Tricotecenos

A determinação analítica de tricotecenos é complexa em virtude de alguns aspectos como: 1) a grande faixa de polaridade dos componentes do grupo dificulta a extração da matriz. Os solventes utilizados arrastam também uma série de compostos interferentes, tornando necessário etapas de limpeza; 2) a ocorrência simultânea de diferentes tricotecenos com diferentes níveis de toxicidade, tornando desejável quantificá-los separadamente, o que vem a apontar os métodos cromatográficos como os mais indicados; 3) a falta de absorvância nas faixas do ultra-violeta e visível e ausência de fluorescência, de alguns tricotecenos , cria a necessidade de uma derivação que possibilite determiná-los

por cromatografia líquida (EPPLEY, 1975; SCOTT, 1982; ROMER, 1986; SNYDER, 1986).

#### **4.1. Métodos Cromatográficos**

A determinação de micotoxinas envolve métodos cromatográficos na etapa de quantificação devido a necessidade de separar as toxinas dos muitos possíveis interferentes. Os processos cromatográficos, por sua vez, não dão certeza quanto a identidade do composto, criando-se obrigatoriedade de etapas de confirmação.

##### **4.1.1. Cromatografia em Camada Delgada - CCD**

A separação dos tricotecenos uns dos outros não vem a ser um grande problema, mas a separação de um tricoteceno individual dos componentes do extrato da amostra é freqüentemente muito difícil. A CCD tem se mostrado bastante satisfatória na determinação em que tricotecenos estão presentes em uma amostra e na separação dos mesmos (EPPLEY, 1975).

A CCD foi o método inicialmente empregado para a determinação semi-quantitativa, ou como técnica auxiliar na determinação quantitativa de tricotecenos em grãos. Apesar da simplicidade da técnica, alguns problemas estão associados a ela. Um deles são os altos limites de detecção e a ausência de fluorescência de alguns tricotecenos quando revelados com p-anisaldeído e ácido sulfúrico (SCOTT, 1982).

MAROCHI *et al.* (1996) desenvolveram um método para a determinação e confirmação da identidade de 5 tricotecenos a partir de reações

químicas, como acetilação, em camada delgada e a utilização de diferentes reveladores.

#### **4.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE**

A determinação de tricotecenos por CLAE é difícil em virtude da falta de absorção na faixa do ultra-violeta, exceto para os tricotecenos do grupo B como o DON, que possui máximo de absorção em 225nm. A toxina T-2, a toxina HT-2 e o diacetoxiscirpenol (DAS) têm sido detectados diretamente apenas por refractometria diferencial (SCHMIDT, 1981; SCOTT, 1982). A sensibilidade para padrões de toxina está na faixa de microgramas, por isso a técnica é inviável para análise de grãos. Mesmo assim, SCOTT (1982) relatou que WARE & THROPE (1979) conseguiram um limite de detecção de 60 ng/g para a determinação de toxina T-2, toxina HT-2 e DAS p-nitrobenzoatados em amostras de milho com recuperação maior que 80% (SCOTT, 1982).

Alguns pesquisadores descreveram a determinação de tricotecenos por CLAE após derivação. Os tricotecenos têm sido derivados com p-nitrobenzoil clorado na presença de 4-dimetilamino-piridina (4-DMAP) em acetonitrila para efetuar a separação por CLAE, resultando em um derivado detectável a 254nm. (MAYCOCK & UTLEY, 1985; LAUREN & GREENHALGH, 1987; COHEN & BOUTIN-MUMA, 1992; LANGSETH & RUNDBERGET, 1998).

GILBERT *et al.* (1992) publicaram um estudo colaborativo, onde amostras de trigo e milho, certificadas, foram analisadas para a determinação de DON. Dentre os dez laboratórios que participaram do estudo, cinco escolheram CLAE para a realização das análises. O método utilizado por eles empregou extração com acetonitrila:água em várias proporções, com uma exceção onde foi empregada a mistura de água:clorofórmio:etanol. Os métodos de limpeza constaram de colunas de carvão:alumina:celite, resina trocadora de cátions,

Florisil e sílica gel, sozinhas ou em combinações. Os participantes utilizaram coluna de fase-reversa C<sub>18</sub> e detecção por UV e um deles utilizou detector por fluorescência. A fase móvel constou de metanol:água em diversas proporções. A detecção no UV foi realizada entre 220 e 224 nm. Para detecção por fluorescência, os comprimentos de onda utilizados foram: excitação, 397 nm e emissão, 505 nm. Os limites de detecção variaram entre 50, 20 e 10 µg/kg. A recuperação variou entre 91 e 76%.

LAUREN & GREENHALGH (1987) também desenvolveram um método de CLAE para a determinação de DON e NIV em cereais, utilizando fase reversa e detecção a 222 nm. As amostras, milho e trigo, foram extraídas com acetonitrila:água (85:15) e uma alíquota foi purificada passando por uma coluna combinada de resina trocadora de cátion e alumina: carvão (20+1). A recuperação das amostras artificialmente contaminadas com DON e NIV variou entre 83 e 94%.

MAYCOCK & UTLEY (1985) analisaram padrões de toxina T-2, DAS, DON e NIV derivados com p-nitrobenzoil em meio a 4-DMAP por CLAE. Utilizaram como fase móvel acetonitrila: tampão fosfato 0,2M. A detecção foi realizada a 220 nm.

Apesar de diversos autores terem desenvolvido métodos de CLAE para a determinação de tricotecenos, esta técnica não é muito utilizada porque a sensibilidade é inferior a obtida por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons ou de massas (SNYDER, 1986).

JIMÉNEZ & MATEO (1997) afirmam e mostram em seu trabalho, o desenvolvimento de um método de CLAE com detecção por UV mais sensível que o de cromatografia gasosa (CG), com detecção por ionização em chama (IC), para tricotecenos do grupo B. O método proposto emprega como sistema de extração metanol:NaCl 1% (60:40), desengorduramento com n-hexano e partição com diclorometano. A limpeza é realizada em colunas Sep-Pak C<sub>18</sub> e os cartuchos

são eluídos com metanol:água (40:60) seguidos de metanol. As duas frações são coletadas separadamente. Na primeira fração (metanol:água), os autores determinam tricotecenos do grupo B por CLAE com detecção por UV a 225nm. Empregam uma coluna ODS-2 e como fase móvel metanol:água (35:65). Na segunda fração, determinam tricotecenos do grupo A por CG. Realizam derivação com Tri-Sil TBT por 1 hora a 45°C. Os limites de detecção, para o método de CLAE, foram 5, 5, 9 e 9 ng/g para NIV, DON, 3-ADON e 15-ADON, respectivamente. Já os limites de detecção para CG-IC para tricotecenos B variam entre 17-20 ng/g e entre 18-23 ng/g para tricotecenos do grupo A.

CAHIL *et al.* (1999) desenvolveram um método de CLAE para DON em trigo. Este método emprega coluna de imunoafinidade (DON test kit HPLC-VICAN, Watertown, MA, USA) para o isolamento da toxina e CLAE para detecção (UV) e quantificação da toxina. O limite de detecção foi de 0,1µg/g e a média de recuperação foi de 90% com um desvio de 8,3%. Os autores realizaram teste para verificar a capacidade da coluna e o valor encontrado foi de 3,3µg e a faixa ótima de trabalho (para o teste) foi de 0,1 a 10,0 µg/g.

JIMÉNEZ *et al.* (2000) desenvolveram um método para analisar tricotecenos do grupo A por CLAE com detecção por fluorescência usando cloreto de carbonil-3-coumarina como reagente de derivação. Neste trabalho, os autores mostram como sintetizar este reagente. A limpeza dos extratos é realizada após a reação de derivação, com o intuito de eliminarem todos os interferentes, inclusive os formados após a reação. Foram testados três sistemas de limpeza, dois baseados na extração em fase sólida e um constando de partição (líquido-líquido). Os autores mostram que o melhor procedimento de isolamento das toxinas foi a partição. A recuperação obtida foi de 70% para todas as toxinas estudadas. Os limites de detecção para toxina T2 foram de 10 ng/g e para as demais toxinas do grupo foi 15 ng/g. Este método foi desenvolvido para arroz e milho.

#### 4.1.3. Cromatografia Gasosa - CG

A cromatografia gasosa (CG) é a técnica cromatográfica mais utilizada na separação de misturas de tricotecenos. A CG inclui necessariamente etapas prévias de extração e limpeza. Os solventes empregados na fase de extração são de caráter polar, como o metanol e acetonitrila em misturas com água. A clarificação é feita por adição de agentes precipitantes, sendo o sulfato de amônio um dos mais empregados. Amostras gordurosas requerem uma etapa de desengorduramento. O emprego de minicolunas de limpeza é comum e os adsorventes geralmente utilizados são sílica gel, Florisil, carvão ativo, celite e alumina, individualmente ou em misturas (ROMER, 1986, TRENHOLM *et al.*, 1985; MAROCHI & SOARES, 1993; FURLONG & SOARES, 1995a).

Um ponto crítico na determinação de tricotecenos vem a ser a derivação, efetuada previamente ao processo cromatográfico. Seu emprego advém da necessidade em reduzir a polaridade dos grupamentos livres, aumentar a pressão de vapor dos compostos, possibilitar a separação de substâncias muito semelhantes entre si no estado natural e introduzir grupos que tornam o composto adequado ao sistema de detecção empregado (ROMER, 1978; SNYDER, 1986). No caso dos tricotecenos, a derivação do grupo hidroxila é vital para melhorar a volatilidade dos tricotecenos e melhorar suas propriedades cromatográficas. Para estas micotoxinas são utilizadas derivações do tipo silililação, fluoroacetilação e fluoroalquilação. Outro sistema de derivação é a acetilação com anidrido acético em meio a piridina (SNYDER, 1986).

Alguns reagentes de derivação vêm sendo utilizados com sucesso para determinação de tricotecenos por cromatografia gasosa. São eles: (a) heptafluorobutirilimidazol (HFBI), pentafluoropropionilimidazol (PFPI) (SCOTT, 1986, 1989, 1993, 1997; KRISHNAMURTHY & SARVER, 1986); (b) anidrido heptafluorobutírico (HFBA) (MUÑOZ *et al.*, 1990; CROTEAU *et al.*, 1994); (c) anidrido trifluoroacético (TFAA) (VISCANTI *et al.*, 1989; LAUREN & AGNEW,

1991; SCUDAMORE *et al.*, 1998); (d) agentes para trimetilsilililação (SCOTT, 1986, 1989, 1997).

Derivados heptafluorobutirados (HFB) de tricotecenos foram os primeiros a serem aplicados na determinação de toxina T-2 e diacetoxiscirpenol, que reagem rapidamente à temperatura ambiente com HFBI, e posteriormente para a determinação de desoxinivalenol que requer aquecimento por 1 hora a 60°C. Um segundo reagente bastante utilizado na heptafluorobutirilação de tricotecenos é o anidrido heptafluorobutírico (HFBA) com 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) ou trimetilamina como catalisadores dissolvidos em solvente orgânico (KANHERE & SCOTT, 1990). Os ésteres de heptafluorobutiril dão ótimas respostas em sistema de detecção por captura de elétrons (SCOTT, 1982) e por ionização química em espectrômetro de massas (KRISHNAMURTHY & SARVER, 1986). Os menores limites de detecção para DON-tri-HFB foram 10 pg (1 ng/g) (COHEN & LAPOINTE, 1982) por captura de elétrons e 0,1 pg (0,1 ng/g) por espectrometria de massa com ionização química (KRISHNAMURTHY & SARVER, 1986). O peso molecular dos ésteres de HFB pode exceder a faixa de massas do espectrômetro, como por exemplo, o DON-tri-HFB que possuiu peso molecular de 884. Por isso a utilização de ésteres de pentafluoropropionil (PFP) ou trifluoroacetil são, às vezes, preferidos (KRISHNAMURTHY & SARVER, 1986).

A silililação e a acetilação são técnicas amplamente utilizadas na derivação de tricotecenos, embora a diversidade das propriedades destas micotoxinas não permita o sucesso de um único derivador para todos os tricotecenos. A análise torna-se difícil quando uma mistura está presente em uma única amostra. Problemas relacionados com os reagentes acima incluem, metodologia complicada, derivação incompleta, difícil eliminação por evaporação dos reagentes derivadores, decomposição de certos derivados, falta de especificidade (WREFORD & SHAW, 1987).

Quando se utiliza detecção por captura de elétrons ou por ionização em chama, os ésteres de TFA são preferidos, em virtude de sua maior volatilidade. O peso molecular mais baixo dos ésteres de TFA os torna utilizáveis para a detecção por espectrômetro de massas (WREFORD & SHAW, 1987).

O tipo de coluna que efetua a separação no cromatógrafo é um fator determinante na qualidade dos resultados obtidos para os tricotecenos em estudo. O aparecimento das colunas capilares tornou possível a detecção e a separação de compostos muito semelhantes e que aparecem em traços nos alimentos. As fases estacionárias que podem ser utilizadas para a separação de tricotecenos incluem-se em uma larga faixa em termos de polaridade: metil silicone; 50% fenilmetil silicone; 7% ou 14% cianopropilfenil metil silicone; 50% fenilmetil silicone; 50% trifluoropropil metil silicone e 25% cianopropil fenil metil silicone (SCOTT & KANHERE, 1986).

A detecção de tricotecenos por cromatografia gasosa vem sendo empregada para amostras de cereais, como milho, trigo, aveia, arroz, centeio, cevada e seus derivados, misturas destes cereais em rações e outros tipos de grãos como soja e amendoim (TANAKA, 1988). Também são relatadas determinações de tricotecenos e seus metabólitos, por esta técnica, em plasma, urina e fezes de suínos, bovinos e cachorros (ROOD *et al.*, 1986; BETINA, 1989).

ONJI *et al.* (1998) desenvolveram um método de CG-EM (impacto de elétrons) para tricotecenos utilizando um sistema de injeção "on-column". Neste método os tricotecenos não sofreram reação de derivação. O limite de detecção do método, para cevada ficou na faixa de 0,1 a 0,5  $\mu\text{g/g}$ . As médias de recuperação foram de 93,1% para DON, 3-ADON, 15-MAS, DAS e toxina T2 e 46% para fusarenona X e scirpentriol, quando amostras de cevada eram contaminadas com 1  $\mu\text{g/g}$ .

## 4.2. Imunoensaios

Muitos métodos químicos e biológicos foram propostos e aplicados na detecção e na quantificação tricotecenos em alimentos e fluídos biológicos. A CG e a CG em combinação com espectrometria de massas são amplamente empregados, mas estes métodos necessitam de numerosas etapas de limpeza previamente à análise cromatográfica. Após a introdução dos métodos imunoenzimáticos para a detecção e quantificação de contaminantes ambientais, muitos métodos empregando ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) estão sendo propostos para tricotecenos como, tais como a toxina T-2, o desoxinivalenol, 3,15- diacetil-desoxinivalenol, nivalenol e toxina HT-2, com anticorpos monoclonais ou policlonais (NAGAYAMA *et al.*, 1988).

No artigo de WOLF-HALL & BULLERMAN (1996), os autores comparam o método de cromatografia em camada delgada (CCD) da AOAC (citado por WOLF-HALL & BULLERMAN,1996) com um “kit” ELISA para a detecção e quantificação de desoxinivalenol em amostras de trigo e milho. De acordo com os autores, o método de CCD causa leituras errôneas em virtude dos co-extratos presentes nas amostras, além de desperdiçar muito solvente, pois o método emprega grandes quantidades de acetonitrila. Para WOLF-HALL & BULLERMAN (1996), o ELISA é um método muito mais rápido, requerendo apenas um dia para a análise de 51 amostras; já a CCD necessitou uma semana para o mesmo número de amostras. Os autores afirmam que o ELISA detecta menores quantidades de DON em amostras de grãos que a CCD.

CHU & LI (1994) determinaram tricotecenos do grupo A por ELISA indireto. Para este teste as micotoxinas foram extraídas, de amostras de milho, com 50% de acetonitrila. Os extratos foram hidrolisados e acetilados antes de se

proceder ao ensaio imunológico. Para os tricotecenos do tipo B, os extratos de milho foram apenas acetilados previamente ao radioensaio. As concentrações encontradas foram muito altas: 139 a 2030 ppb, com média de 627 ppb para tricotecenos do grupo A; e 470 a 5826 ppb, com média de 2359 ppb para tricotecenos do tipo B. FAN *et al.* (1987) desenvolveram um método de ELISA indireto para as toxinas HT-2 e T-2 com limites de detecção de 0,5 a 5,0 ppb.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS MOAGEIRAS DE MILHO-ABIMILHO. **Visão do Setor.** <http://www.abimilho.com.br/setor.html>. Arquivo capturado em 20 de setembro de 2000.

BETINA, V. Chromatographic methods as tools in the field of mycotoxins. **Journal of Chromatography**, v. 447, n. 1, p. 187-234, 1989.

BLACK, R. M.; CLARKE, R. J.; READ, R. W. Detection of trace levels of trichothecene mycotoxins in environmental residues and foodstuffs using gas chromatography with mass spectrometric or electron capture detection. **Journal of Chromatography**, v. 388, n. 2, p. 365-378, 1987.

- CAHIL, L. M.; KRUGER, S.C.; McALICE, B. T.; RAMSEY, C.S.; PRIOLI, R.; KOHN, B. Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 859, n. 1, p. 23-28, 1999.
- CHU, F. S.; LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from people's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 847-852, 1994.
- CLEVSTROM, G. **Studies of fungi flora of plants and feeds and the influence of formic acid on growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus***. Upsala, Sweden. 1986. (Dissertation – Departament of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences), 1986.
- COHEN, H.; BOUTIN-MUMA, B. Fluorescence detection of trichothecene mycotoxins as coumarin-3-carbonyl chloride derivatives by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 595, n. 1+2, p. 143-148, 1992.
- COHEN, H.; LAPOINTE, M. Capillary gas-chromatographic determination of vomitoxin in cereal grains. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 65, n. 6, p. 1429-1434, 1982.
- CROTEAU, S. M.; PRELUSKY, D. B.; TRENHOLM, H. L. Analysis of trichothecenes mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 928-933, 1994.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

- 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.
- EPPLEY, R.M. Methods for the detection of trichothecenes. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v. 58, n. 5, p. 906-908, 1975.
- FAN, T. S. L.; XU, Y-C.; CHU, F. S. Simultaneous analysis of T-2 toxin and HT-2 toxin by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v. 70, n. 4, p. 657-661, 1987.
- FANULLI, A.L.; LIMA, U. A. **Milho: produção, pré-colheita e transformação agroindustrial**. São Paulo: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz-FEALQ, p. 1-3, 1982.
- FURLONG, E. B.; SOARES, L. M. V. Gas chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists International**, v. 78, n. 2, p. 386-390, 1995a.
- FURLONG, E. B.; SOARES, L .M. V.; LASCA, C. C.; KOHARA, E. Y. 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.
- FURLONG, E.B.; SOARES, L. M. V.; LASCA, C. C.; KOHARA, E. Y. Mycotoxins and fungi in wheat harvestes during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathology**, v. 131, p. 185-190, 1995c.

- GILBERT, J.; SHARMAN, M.; PATEL, S.; BOENKE, A.; WAGSTAFFE, P. J. Deoxynivalenol in wheat and maize flour reference materials . 2. Preparation and certification. **Food Additives and Contaminants**, v. 9, n. 2, p. 119-135, 1992.
- GRANDONI, K. M.; GENTRY, P. A.; HOLUB, J.; YAGEM, B. Comparative effects of trichothecene mycotoxins on bovine platelet function: acetyl T2, a more potent inhibitor than T2 toxin. **Mycotoxin Research**, v. 6, n. 2, p. 61-63, 1990.
- HIETANIEMI, V.; KUMPULAINEN, J. Contents of *Fusarium* toxins in Finnish and imported grains and feeds. **Food Additives and Contaminants**, v. 8, n. 2, p. 171-182, 1991.
- JACOBSEN, B. J.; BOWEN, K. L.; SHELBY, R. A.; DIENER, U. L.; KEMPPAINEN, B. W.; FLOYD, J. Mycotoxins and mycotoxicoses. **Alabama Cooperative Extension System**. Circular ANR-767, 02, 1993.
- JIMÉNEZ, M.; MATEO, R. Determination of mycotoxins produced by *Fusarium* isolates from banana fruits by capillary gas chromatography and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 778, n. 2, p. 363-372, 1997.
- 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**, v. 870, n. 1, p. 473-481, 2000.
- KANHERE, S.R.; SCOTT, P.M. Heptafluorobutyrylation of trichothecenes using a solid phase catalyst. **Journal of Chromatography**, v. 511, p. 384-389, 1990.

- KIESSLING, K.H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 327-338, 1986.
- 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 and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3798-3802, 1993.
- KOLLARCZIK, B.; GAREIS, M.; HANELT, M. In vitro transformation of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. **Natural Toxins**, v. 2, n. 2, p. 105-110, 1994.
- KOTAL, F.; HOLADOVÁ, K.; HAJŠLOVÁ, J.; POUŠTKA, J.; RADOVÁ, Z. Determination of trichothecenes in cereals. **Journal of Chromatography A**, v. 830, n. 1, 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, n. 1, p. 253-264, 1986.
- LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 103-121, 1998.
- LAUREN, D. R.; AGNEW, M. P. Multitoxin screening method for *Fusarium* mycotoxins in grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 502-507, 1991.

- LAUREN, D. R.; GREENHALGH, R. Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by liquid chromatography. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v. 70, n. 3, p. 479-483, 1987.
- MARASAS, W. F. O.; SMALLEY, E. B. Mycoflora, toxicity and nutritive value of mouldy maize. **Onderstepoort Journal of Veterinary Medicine**, Pretoria, v. 39, p. 1-10, 1972.
- MARASAS, W. F. O.; WEHNER, F. C.; Van RENSBURG, S. J.; Van SCHALKWYK. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkey, Southern Africa. **Phytopathology**, v. 71, n. 8, p. 792-796, 1981.
- MAROCHI, M. A.; SOSRES, L. M. V. Metodologia para a 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. Z. P. Testes confirmatórios para tricotecenos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 2, p.17-20, 1996.
- MAYCOCK, R.; UTLEY, D. Analysis of some trichothecene mycotoxins by liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 347, n. 3, p. 429-433, 1985.
- MUNÓZ, L.; CARDELLE, M.; PEREIRO, M.; RIGUERA, R. Occurrence of corn mycotoxins in Galicia (Northwest Spain). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 1004-1006, 1990.
- NAGAYAMA, S.; KAWAMURA, O.; OHTANI, K.; RYU, J-C.; LATUS, D.; SUDHEIM, L., UENO, Y. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for screening of T-2 toxin-producing *Fusarium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1302-1303, 1988.

- NOGUEIRA JÚNIOR, S.; NOGUEIRA, E.A.; TSUNECHIRO, A. **Consideração Sobre a Agroindústria do milho**. São Paulo: Instituto Econômico de Agricultura, v.27, p. 1-18, 1987. (Relatório de Pesquisa).
- 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**, v. 815, n. 1, p. 59-65, 1998.
- OSBORNE, B. G. Mycotoxins and the cereals industry - a review. **Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 1-9, 1982.
- PACIN, A. M.; RESNIK, S. L.; NEIRA, M. S.; MOLTO, G., MARTINEZ, E. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and barley products in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 4, p. 327-331, 1997.
- PARK, J. C.; ZONG, M. S.; CHANG, I. M. Survey of the presence of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and T-2 toxin in Korea cereals of the 1989 harvest. **Food Additives and Contaminants**, v. 8, n. 4, p. 447-451, 1991.
- PARK, J. J.; SMALLEY, E. B.; CHU, F. S. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in field samples from the 1992 Wisconsin corn crop. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1642-1648, 1996.
- PASTER, N.; BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as Controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 257-265, 1988.
- PERKOWSKI, J.; JELEN, H.; KIECANA, I.; GOLINSKI, P. Natural contamination of spring barley with group A trichothecene mycotoxins in southeastern Poland. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n. 4, p. 321-325, 1997.

- PLACINTA, C. M.; D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M .C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, n. 1, p. 21-37, 1999.
- POMERANZ, Y. Biochemical, functional and nutritive changes during storage. In: CHRISTENSEN, C. M. ed. **Storage of Cereal Grains and their Products**. 3<sup>a</sup> ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1982. p. 145-217.
- PRELUSKY, D. B.; TRENHOLM, H. L., 1991. Tissue distribution of deoxynivalenol in swine dosed intravenously. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 4, p.748-751, 1991.
- ROMER, T. R. Use of small charcoal/alumina clean-up columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v. 69, n. 4, p. 699-703, 1986.
- ROMER, T. R.; BOLING, T. M.; MacDONALD, J. L. Gas-liquid chromatography determination of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v. 61, n. 4, p. 801-808, 1978.
- 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, n. 2, 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.; YANG, J. S.; SONG, Y. S.; KWON, O. S.; PARK, J.; CHANG, I. M. Survey of natural occurrence of trichothecene mycotoxins and zearalenone in Korea cereals harvested in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 3, p. 333-341, 1996.
- SABINO, M.; ICHIKAWA, A. H.; INOMATA, E. I.; LAMARDO, L. C. A. Determinação de desoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 49, p. 155-159, 1989.
- SCHMIDT, R.; ZIEGENHAGEN, E.; DOSE, K. High performance liquid chromatography of trichothecens. I. Detection of T2 toxin and HT2 toxin. **Journal of Chromatography**, v. 212, n. 3, p. 370-373, 1981.
- SCOTT, P.M. Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grain products. **Journal of the Association Official of 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.
- SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R. Comparison of column phases for separation of derivatized trichothecenes by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 368, n. 2, p. 374-380, 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 Official of Analytical Chemists**, v. 64, n. 6, p. 1364-1371, 1981.
- SCOTT, P. M.; LOMBAERT, G. A.; DELLARES, P.; BACLER, S.; KANHERE, S. R.; SUN, W. F.; LAU, P. Y.; WEBER, D. 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.
- SCUDAMORE, K. A.; NAWAZ, S.; HETMANSKI, M. T. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs:II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 1, p. 30-55, 1998.
- SEMENIUK, G. Microflora. In: ANDERSON, J. A., ALCOCK, A. E. Eds. **Storage of Cereal Grains and their Products**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 1954. V. 2, p. 77-151.
- SHEPHERD, M. J.; GILBERT, J. Long-term storage stability of deoxynivalenol standard reference solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 305-308, 1988.
- SHOTWELL, O. L.; BENNETT, G. A.; STUBBLEFIELD, R. D.; SHANNON, G. M., KWOLEK, W. F.; PLATTNER, R. D. Deoxynivalenol in hard red winter wheat: relationship between toxin levels and factors that could be used in grading. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v. 68, n. 5, p. 954-957, 1985.
- SILLIKER, J. H.; ELLIOTT, R. P. **Ecologia Microbiana de los Alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia. 1980. V. 1, p. 74-96.

- SNYDER, A. P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 49, n. 7, p. 544-569, 1986.
- SOHN, H. B.; SEO, J. A.; LEE, Y. W. Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, n. 4, p. 153-158, 1999.
- SUGIURA, Y.; FUKASAKU, K.; TANAKA, T.; MATSUI, Y.; UENO, Y. *Fusarium poae* and *Fusarium crookwellense*, fungi responsible for the natural occurrence of nivalenol in Hokkaido. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3334-3338, 1993.
- SUTTON, J. C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 4, p. 195-209, 1982.
- TANAKA, T.; YAMAMOTO, S.; HASEGAWA, A.; AOKI, N.; BESLING, J.R. Worldwide contamination of cereals by *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. I survey of 19 countries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 6, 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, n. 1, p. 23-28, 2000.
- THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; GELDERBLUM, W. C. A.; NIEUWENHUIS, J. J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n. 4, p. 1089-1093, 1991.

- TRENHOLM, H. L.; WARNER, R. M.; PRELUSKY, D. B. Assessment of extraction procedures in the analysis of naturally contaminated grain products for deoxynivalenol (vomitoxin). **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v. 68, n. 4, p. 645-649, 1985.
- UENO, Y. **Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects**. Tokyo: Elsevier, v. 4, 1983.
- UENO, Y. Mode of action of trichothecenes. **Pure and Applied Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 1737-1745, 1977.
- UENO, Y. Trichothecenes as Environmental Toxicants. **Reviews in Environmental Toxicology 2**, Amsterdam, p. 303-341, 1986.
- VISCONTI, A.; MIROCHA, C. J.; LOGRIECO, A.; BOTTALICO, A.; SOLFRIZZO, M. Mycotoxins produced by *Fusarium acuminatum*. Isolation and characterization of acuminatin: a new trichothecene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1348-1351, 1989.
- WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. **Corn: Chemistry and Technology**, St. Paul: American Association of Cereal Chemists, p. 55, 420-421, 1987.
- WOLF-HALL, C. E.; BULLERMAN, L. B. Comparison of thin layer chromatography and an 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.
- 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.

## Capítulo 2

---

### **Avaliação de Métodos para Determinação de Tricotecenos em Milho por Cromatografia Gasosa**

## Resumo

---

Sistemas de extração e limpeza foram avaliados para a determinação de tricotecenos em milho pipoca. O método de extração descrito por FURLONG & SOARES (1995), combinado com a coluna de limpeza de ROMER (1986), foi o método que apresentou melhores resultados. A extração foi realizada com metanol:cloreto de potássio 4% (9:1) seguida por clarificação com sulfato de amônio 30% e partição com diclorometano. A seguir, o extrato foi passado pela coluna de alumina:carvão (2,3 : 1,9) e eluído com acetonitrila:água (84:16). O reagente de derivação empregado foi o anidrido trifluoroacético (TFAA) em piridina anteriormente a etapa de cromatografia gasosa com detector por ionização em chama. As recuperações médias obtidas foram 72% para desoxinivalenol (DON), 88% para diacetoxiscirpenol (DAS) e 87% para toxina T2 (T2). Os limites de detecção encontrados foram 30ng/g para DON, 50ng/g para DAS e 40ng/g para T2. Os coeficientes de variação médios para amostras artificialmente contaminadas, no nível de 500 ng/g foi 9,8, 6,3 e 6,6 % para DON, DAS e T2, respectivamente.

---

## INTRODUÇÃO

Os tricotecenos são uma família de micotoxinas caracterizadas por um esqueleto tetracíclico 12,13-epoxi-tricotec-9-eno. Estas micotoxinas são compostos com funções éster e álcool na porção externa da molécula. Possuem uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 e um grupo epóxido entre os carbonos 12 e 13. Os tricotecenos são produzidos por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium*, *Stachybotrys* e *Trichothecium* (UENO, 1983). Um total de 148 tricotecenos são conhecidos. Apenas alguns tricotecenos foram observados ocorrerem naturalmente, como por

exemplo o desoxinivalenol (DON), o nivalenol (NIV), a toxina T2 (T2), a toxina HT2 (HT2) e o diacetoxiscirpenol (DAS) (KOTAL *et al.*, 1999).

Cereais contaminados por diversas espécies de *Fusarium* são a possível fonte de tricotecenos em alimentos destinados ao consumo humano e de animais. Dentre os vários cereais, o trigo e o milho parecem ser os mais susceptíveis à contaminação. O DON tem sido o tricoteceno mais freqüentemente encontrado nos cereais (LANGSETH & RUNDBERGET, 1998).

Os sintomas característicos dos efeitos tóxicos dos tricotecenos em humanos e animais são vômitos, angina necrótica, diarreia, anorexia, alterações hematológicas, distúrbios neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragias generalizadas, seguidos ou não de morte (SNYDER, 1986; UENO, 1986). A doença em humanos que está associada a estes sintomas chama-se Aleucia Tóxica Alimentar (ATA). Casos fatais desta doença ocorreram em 1913 e após a Segunda Guerra Mundial em populações localizadas em regiões da antiga Rússia (OSBORNE, 1982; UENO, 1983; SNYDER, 1986; JACOBSEN *et al.*, 1993).

Por estarem, os tricotecenos, presentes em traços nos alimentos destinados ao consumo humano e rações animais, métodos analíticos sensíveis e específicos tornam-se necessários. O primeiro método desenvolvido para a determinação de tricotecenos em grãos foi a cromatografia em camada delgada (CCD). Os tricotecenos eram visualizados com diversos reagentes reveladores. Um deles, o cloreto de alumínio, foi amplamente empregado para tricotecenos do grupo B (LANGSETH & RUNDBERGET, 1998). A determinação de tricotecenos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é difícil em virtude da falta de absorção na faixa do ultra-violeta (UV), exceto para tricotecenos do grupo B. Para tricotecenos do grupo A, CLAE, com detecção por UV, é aplicada somente para culturas com altas concentrações de toxina. Muitos pesquisadores descreveram a determinação de tricotecenos por CLAE após derivação. A desvantagem deste

método está na presença de picos dos reagentes de derivação que interferem com os picos de alguns tricotecnos (MAYCOCK, 1985; LAUREN & GREENHALGH, 1987; LANGSETH & RUDENBERGET, 1998). Dentre os métodos cromatográficos, a cromatografia gasosa (CG) é a técnica mais empregada na determinação de tricotecnos em diversos tipos de amostras, com detecção por captura de elétrons (CE), espectrômetro de massas (EM) ou por ionização em chama (IC), respectivamente nesta ordem.

A cromatografia gasosa (CG), apesar de necessitar de extensas e trabalhosas etapas de limpeza, oferece alta resolução na separação através do emprego de colunas capilares. A seletividade e sensibilidade vão depender do sistema de detecção empregado. A versatilidade da CG facilita o desenvolvimento de métodos para análises de rotina no caso de amostras contendo vários tricotecnos (CROTEAU *et al.*, 1994). Esta técnica inclui etapas de extração, limpeza, e na maioria dos casos, uma reação de derivação compatível com o sistema de detecção utilizado. Os solventes empregados na etapa de extração são de caráter polar, como o metanol e a acetonitrila em misturas com água. Quando a extração é feita com metanol, uma etapa de clarificação se faz necessária. Um dos agentes precipitantes mais utilizados é o sulfato de amônio. Dependendo do tipo de amostra, quando muito gordurosa, há a necessidade de uma etapa de desengorduramento, normalmente, com n-hexano. Na etapa de limpeza, ou isolamento das toxinas, é comum o emprego de colunas de extração em fase sólida (SPE), e os adsorventes mais utilizados são carvão ativo, celite, alumina, sílica gel, Florisil individualmente ou em misturas (ROMER, 1986; FURLONG & SOARES, 1995; MAROCHI, 1993).

A reação de derivação, previamente à separação cromatográfica à gás, é necessária para melhorar a volatilidade e outras propriedades cromatográficas dos tricotecnos. Os agentes de derivação mais empregados para tricotecnos são o anidrido trifluoroacético (TFAA), o

heptafluorobutirilimidazol (HFBI), o anidrido heptafluorobutírico (HFBA) e o pentafluoropropionilimidazol (PFPI).

Em virtude da falta de uma metodologia para a determinação de DON, NIV, T2 e DAS em milho pipoca adaptado à realidade dos laboratórios nacionais, este trabalho teve como objetivos: a) avaliar qual o melhor agente de derivação para estes tricotecenos quando se emprega detector por ionização em chama; b) avaliar qual o melhor sistema de extração e limpeza para amostras de milho pipoca e c) estabelecer e validar um método para a determinação de DON, NIV, DAS e T2 em milho pipoca.

## MATERIAL E MÉTODOS

**1. Amostras:** as amostras de milho pipoca, tanto de marcas como à granel, foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Campinas em pacotes de 500g. Estas foram trituradas em moinho até passarem por uma peneira de 80 mesh, acondicionadas em recipientes de vidro e armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

### 2. Padrões

**2.1. Tricotecenos - desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxina T2 (T2) e diacetoxiscirpenol (DAS):** as soluções estoque individuais de cada tricotecenos – DON, NIV, T2 e DAS – (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO) foram preparadas pesando-se 1 mg da cada toxina, dissolvendo em 10 mL de benzeno, segundo FURLONG & SOARES (1995), e obtendo-se a concentração de  $100\mu\text{g/mL}$ . As soluções trabalho foram preparadas em concentração  $40\mu\text{g/mL}$  para cada toxina. Estas soluções foram acondicionadas em frascos âmbar vedados e armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

**2.2. Padrão interno:** Metil araquidato (Poly Science Corp.), a solução estoque foi preparada pesando-se 2,5 mg de metil araquidato, dissolvendo em 5 mL de n-hexano (grau cromatográfico) obtendo-se a concentração de 500µg/mL. A solução trabalho foi preparada em concentração 100µg/mL. Esta solução foi acondicionada em frasco âmbar vedado e armazenado a -18°C.

**3. Solventes e Reagentes:** (grau analítico, exceto quando indicado) metanol, cloreto de potássio (KCl), sulfato de amônio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], clorofórmio, diclorometano, anidrido trifluoroacético (TFAA), heptafluorobutirilimidazol (HFBI), piridina, bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), tolueno (grau cromatográfico) e acetonitrila (grau cromatográfico).

**4. Adsorventes:** carvão ativo (60 mesh e 100-400 mesh/ Sigma), celite, alumina, Florisil (100-400 mesh/ Merck), Amberlite IRP-64 (100-400 mesh/ Sigma), Amberlite CG-50 (100-200 mesh/ Sigma) e Amberlite IR-120 (Merck)

## **5. Equipamentos**

\* **Cromatógrafo à Gás:** marca VARIAN , MODELO Star 3400cx, com detector de ionização em chama e injetor modelo 1078. Coluna capilar DB-1701 ( J & W Scientific ) com 15 metros de comprimento, 0,32mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura de fase estacionária (14% cianopropilfenilmetil polisiloxano). As condições cromatográficas utilizadas foram: temperatura injetor (275°C), temperatura do detector (300°C), programação da coluna (100°C/1mim, 6°C/mim até 220°C/20mim), vazão do gás de arraste (3,6mL/mim) e fluxo de limpeza do injetor (50mL/mim). O volume de injeção foi 1µL, o modo de injeção *splitless* e o tempo de *splitless* (0,75 mim). Software de integração dos dados, Varian Star versão 4.5

\* **Liqüidificador:** comum, de uso doméstico ou equivalente.

\* **Moinho:** modelo 3033, marca PERTEN, ou equivalente.

\* **Banho Maria:** MARCONI, modelo BTC 9090, ou equivalente.

\* **Banho ultra-som:** Microsonic SX 20, ou equivalente.

\* **Pipetas automáticas:** Finnpiptett Digital de 40-200 $\mu$ L e de 200-1000 $\mu$ L (Labsystems), ou equivalentes.

\* **Micro-seringa:** Microliter 701N de 10 $\mu$ L (Hamilton Co., Reno, NA)

\* **Seringas de vidro de 10mL:** seringas de vidro hipodérmica, BD-YALE, ou equivalente.

**6. Avaliação de reagentes de derivação e melhores condições de derivação:** dois agentes de derivação foram testados o HFBI e o TFAA.

**6.1. Derivação com HFBI:** esta derivação foi realizada conforme o método de FURLONG & SOARES (1995). Empregou-se a quantidade necessária de solução de padrão de tricotecenos. Esta foi seca e adicionada de 500 $\mu$ L de tolueno:acetonitrila (95:5) e 50 $\mu$ L de HFBI. A solução foi mantida em banho-maria a 60°C por 60 minutos. Foi retirada do banho, deixada atingir a temperatura ambiente e adicionada de mais 500 $\mu$ L de tolueno:acetonitrila (95:5). A fase orgânica foi lavada duas vezes com 1000 $\mu$ L de tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e foi levada ao congelador para a separação das fases. Uma alíquota da fase orgânica (derivado) foi transferida para um frasco contendo padrão interno e então evaporada sob nitrogênio a temperatura ambiente. O derivado seco foi ressuspendido com 100 $\mu$ L de n-hexano e realizada a análise cromatográfica.

**6.2. Derivação com TFAA:** para este agente derivador duas bases foram testadas, o bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) e a piridina.

\* **Reação em presença de bicarbonato de sódio (TFAA/NaHCO<sub>3</sub>):** Uma alíquota de solução padrão foi tomada e seca à temperatura ambiente sob fluxo de nitrogênio. 20 mg de NaHCO<sub>3</sub> e 200 $\mu$ L de TFAA foram adicionados ao resíduo e a solução resultante foi levada ao banho-maria a 60°C por 60 minutos. Após esfriar, n-hexano foi adicionado e a seguir a mistura foi evaporada. Foram adicionados 500 $\mu$ L de tolueno e duas vezes 1000 $\mu$ L de água deionizada ao derivado seco. Uma alíquota da fase orgânica foi transferida para um frasco contendo o padrão

interno e a solução foi então seca. O derivado seco foi ressuspendido em 100 µL de n-hexano e injetado no cromatógrafo à gás.

\* **Reação em presença de piridina (TFAA/piridina):** uma alíquota com a quantidade necessária do padrão foi tomada e levada para secar. Foram adicionados 1000µL de solução de 1,5 mg/mL de piridina em tolueno:acetonitrila (95:5) e 200µL de TFAA ao resíduo e levados ao banho-maria a 60°C por 60 minutos. Após esfriar a temperatura ambiente, foram então adicionados 2 vezes 1000µL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5%. Uma alíquota da fase orgânica foi transferida para um frasco contendo padrão interno. A mistura foi seca e ressuspendida com 100µL de n-hexano e análise cromatográfica realizada.

**7. Avaliação de sistemas de extração e limpeza:** para a escolha do melhor sistema de extração e limpeza, foram levados em consideração a recuperação dos tricotecnos e a capacidade de limpeza dos extratos das amostras por parte de cada método testado, gerando cromatogramas limpos com poucos picos interferentes. Os métodos testados foram:

**7.1. Teste do sistema de extração e limpeza descrito por FURLONG & SOARES (1995):** 50g de amostra foram homogeneizadas com 270 mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4% por 5 minutos em liquidificador. A mistura foi filtrada e uma alíquota de 150 mL foi tomada e clarificada com 150 mL de sulfato de amônio 30% e 50 cm<sup>3</sup> de celite. A mistura foi filtrada e, novamente, tomada uma alíquota de 150 mL e esta foi transferida para um funil de separação contendo 150mL de água destilada. Foi realizada partição, lenta por 3 minutos, com 10 mL de clorofórmio (2 vezes). Uma alíquota de 5 mL de cada partição foi tomada, misturada e seca. O extrato seco foi ressuspendido em tolueno:acetonitrila (95:5), passado por coluna de carvão:alumina:celite (0,7: 0,5: 0,3) e eluído com 40 mL de tolueno:acetonitrila (95:5). O eluato foi concentrado a 80°C, transferido para frasco de reação e seco. A derivação foi realizada com o reagente desejado e a análise cromatográfica realizada.

**7.2. Teste do sistema de extração descrito por FURLONG & SOARES (1995) combinado com a coluna de limpeza de Florisil (2g):** além da combinação entre o método de extração, descrito no item 7.1, e a coluna de limpeza de Florisil (2g), três eluentes para esta coluna foram testados acetoneitrila:água (84:16), acetoneitrila (100) e clorofórmio:metanol (70:30). O volume de eluição empregado foi 40 mL. Os eluatos foram concentrados, nas temperaturas adequadas, transferidos para frasco de reação e secos. A reação de derivação foi realizada, seguida da análise cromatográfica.

**7.3. Teste do sistema de extração descrito por FURLONG & SOARES (1995) combinado com coluna de limpeza de alumina:carvão (ROMER, 1986):** a amostra de foi extraída como descrito no item 7.1, passada por uma coluna de alumina:carvão (2,3: 1,9) e eluída com 40 mL de acetoneitrila:água (84:16). O eluato foi concentrado a 80°C, transferido para frasco de reação, seco, realizou-se a reação de derivação seguida da análise cromatográfica.

**7.4. Teste do sistema de extração descrito por LANGSETH & CLASEN (1992) combinado com coluna de limpeza alumina:carvão (ROMER, 1986):** 25g de amostra de milho pipoca foram homogeneizadas por 1 hora em shaker com 100 mL de acetoneitrila:água (84:16). O extrato foi filtrado e uma alíquota de 65mL foi concentrada a 80°C até a secura. O extrato seco foi então redissolvido com 5 vezes 1 mL de acetoneitrila:água (84:16), passado pela coluna de alumina:carvão (2,3:19), eluído com 40 mL de acetoneitrila:água (84:16), concentrado a 80°C , transferido para frasco de reação e seco. Procedeu-se a reação de derivação desejada e realizou-se a análise cromatográfica.

**7.5. Teste do sistema de extração descrito por TANAKA (1985) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (ROMER, 1986):** 20g de amostras foram homogeneizadas com 200 mL de acetoneitrila:água (3:1) por 5 minutos. O extrato foi filtrado, uma alíquota de 125 mL foi tomada e realizou-se desengorduramento com 100 mL de n-hexano. Uma alíquota de 85 mL do extrato

desengordurado foi tomada, a esta foram adicionados 100 mL de etanol e a mistura foi concentrada, em roto-evaporador a 50°C, até aproximadamente 5 mL. O extrato concentrado foi transferido para frasco âmbar e secado. O resíduo foi ressuscitado em acetonitrila:água (84:16), passado por coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) e eluído com 40 mL de acetonitrila:água (84:16). O eluato foi concentrado a 80°C, transferido para frasco de reação, seco e a reação de derivação foi executada. Após a derivação, a análise cromatográfica foi realizada.

**7.6. Teste do sistema de extração e limpeza descrito por LAUREN & GREENHALGH (1987):** 20g de amostra e 100 mL acetonitrila:água (85:15) foram homogeneizados por 2 horas em shaker. O extrato foi filtrado e uma alíquota de 65 mL foi concentrada a 80°C. Este método empregava uma coluna que continha como adsorventes 1g de alumina:carvão (20+1) e 2g resina trocadora de cátions, empacotados em camadas sucessivas. Três tipos de resina trocadora de cátions (Amberlite IR-120, IRP-64 e CG-50) foram empregadas para a montagem das colunas. Os extratos concentrados foram passados por estas colunas e eluídos com 40 mL de acetonitrila:água (85:15). Os eluatos foram concentrados a 80°C, transferidos para frasco de reação e secados. A reação de derivação e a análise cromatográfica foram então realizadas

**7.7. Teste do sistema de extração descrito por LAUREN & GREENHALGH (1987) combinado com a limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3 : 1,9 : 2,0):** a amostra foi extraída como descrito no item 7.6, mas a limpeza foi realizada em coluna de alumina : carvão : resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0). Dois sistemas de solventes acetonitrila:água, nas proporções (84:16) e (75:25), foram empregados para a eluição das amostras. O volume de eluição foi 40 mL. A concentração dos eluatos foi feita a 80°C. Após a concentração, os eluatos foram transferidos para frasco de reação e secos. A reação de derivação e a análise cromatográfica foram então realizadas.

**7.8. Teste do sistema de extração descrito por LANGSETH & CLASEN (1992) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0) e eluição com acetonitrila:água (84:16):** previamente à etapa de extração, a amostra de milho pipoca foi desengordurada em extrator de Goldfish por 3 horas. Após o desengorduramento, a amostra foi extraída segundo o item 7.4, passada por coluna contendo alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0), eluída com 40 mL de acetonitrila:água (84:16) e concentrada a 80°C. Após a concentração do eluato este foi transferido para frasco de reação, seco, derivado e se procedeu análise cromatográfica.

**7.9. Teste do sistema de extração descrito por TANAKA (1985) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 ( 2,3 : 1,9: 2,0) e eluição com acetonitrila:água (3:1):** previamente à etapa de extração, a amostra foi desengordurada em extrator de Goldfish por 3 horas. A amostra desengordurada foi extraída segundo o item 7.5, passada por coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,2:1,9:2,0) e eluída com 40 mL de acetonitrila:água (3:1). O eluato foi concentrado a 80°C, transferido para frasco de reação e seco. A reação de derivação e a análise cromatográfica foram então realizadas.

**7.10. Teste do sistema de extração e limpeza descrito por ROSEN & ROSEN (1984):** 10g de amostra foram homogeneizadas com 150 mL de metanol por 3 minutos. O extrato foi filtrado e uma alíquota de 100mL foi desengordurada com 75 mL n-hexano. A fração metanólica foi seca a 60°C. O resíduo foi ressuspensão com 2 mL de metanol e 8 mL de água e colocada em coluna C<sub>18</sub> (pré condicionada com solução de 20% de metanol). 10 mL de solução metanol 20% foram adicionados, e então descartados. Os tricotecenos foram eluídos da coluna de C<sub>18</sub> com metanol:água (85:15). O eluato resultante foi evaporado sob nitrogênio a 60°C. O resíduo foi então dissolvido com 500 µL de tolueno:acetato de etila (1:1) e passado por uma coluna de sílica gel. Outros 10 mL de tolueno:acetato de etila (1:1) foram empregados para a eluição das toxinas da coluna de sílica gel. O

eluato foi concentrado sob nitrogênio a temperatura ambiente, transferido para frasco de reação, derivado e cromatografado.

**7.11. Teste do sistema de extração de SCOTT *et al.* (1981) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (ROMER, 1986):** 30g de amostra foram extraídas com 250 mL de metanol:água (1:1) por 5 minutos em liqüidificador. O extrato foi filtrado e uma alíquota de 100 mL foi clarificada com 100 mL de sulfato de amônio 30% e 25 cm<sup>3</sup> de celite. Novamente uma alíquota de 100 mL foi tomada e foi realizada uma partição 20 mL de acetato de etila. A partição foi realizada mais 3 vezes. As fases de acetato de etila foram combinadas, concentradas a 40°C e secas. O resíduo foi redissolvido em tolueno:acetona (95:5), passado por coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) e eluído com 40 mL de tolueno:acetona (95:5). O eluato foi concentrado a 70°C, transferido para frasco de reação e seco. Após a secagem, o resíduo foi derivado e cromatografado.

**7.12. Teste do sistema de extração descrito por SCOTT *et al.* (1986) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (ROMER, 1986):** 30g de amostra foram extraídas com 250 mL de metanol:água (7:3) por 5 minutos em liqüidificador. O extrato foi filtrado e uma alíquota de 100 mL foi clarificada com 100 mL de sulfato de amônio 10% e 25 cm<sup>3</sup> de celite. Novamente uma alíquota de 100 mL foi tomada e uma partição com 20 mL de acetato de etila foi realizada 2 vezes. As fases de acetato de etila foram combinadas, concentradas a 40°C e secas. O resíduo foi dissolvido com acetato de etila, aplicado em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) e eluído com 40 mL de acetato de etila. O eluato foi concentrado a 40°C, transferido para frasco de reação, derivado e cromatografado.

**7.13. Teste do sistema de extração descrito por FURLONG & SOARES (1995), partição com diclorometano e limpeza em coluna de alumina:carvão (ROMER, 1986):** a amostra foi extraída como descrito no item 7.1, mas a etapa de partição sofreu algumas alterações. A partição foi realizada com 15 mL de

diclorometano (2 vezes). As fases de diclorometano foram misturadas, uma alíquota de 15 mL foi tomada e evaporada a 50°C. O resíduo foi dissolvido com 5 vezes 1 mL de acetonitrila:água (84:16), aplicado em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) e eluído com 40 mL de acetonitrila:água (84:16). O eluato foi concentrado a 80°C, transferido para um frasco de reação, derivado e cromatografado.

**8. Recuperação, repetibilidade, limites de detecção e de quantificação:** a recuperação e a repetibilidade foram testadas em amostras artificialmente contaminadas com 0,5µg/g de cada tricoteceno (DON, T2 e DAS). Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados de acordo com as recomendações da "AMERICAN CHEMICAL SOCIETY" (1980). Uma amostra, não-contaminada naturalmente, foi fortificada com padrão dos tricotecenos, derivada e injetada 5 vezes no cromatógrafo à gás. O desvio padrão ( $\sigma$ ) destas 5 injeções foi então calculado. O limite de detecção de cada tricoteceno foi determinado como sendo a menor quantidade que gerasse um sinal três vezes maior que o ruído ( $\sigma$ ). O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração que produzisse um sinal cinco vezes maior que o limite de detecção. Curvas de calibração interna foram construídas para cada um dos tricotecenos estudados neste trabalho.

**9. Descontaminação do material:** todo material utilizado nas análises foi descontaminado com solução comercial de hipoclorito de sódio por 24 horas. Após o período de descontaminação, o material foi lavado normalmente, enxaguado com água destilada e seco em temperatura ambiente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

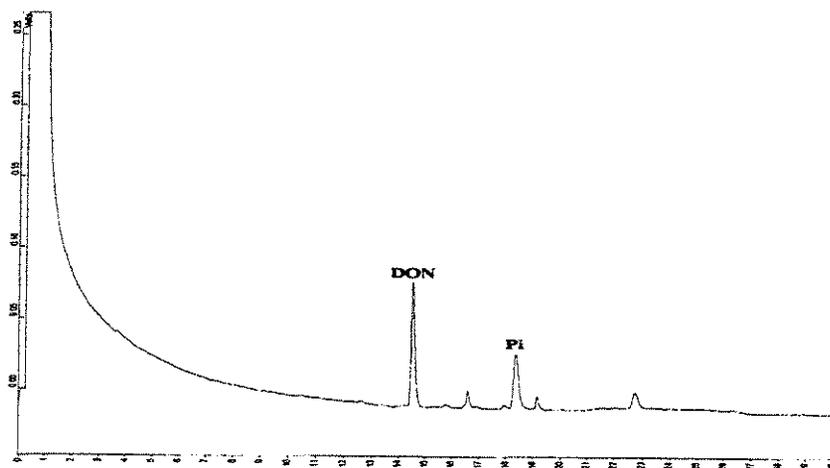
### 1. Escolha do melhor agente de derivação e melhores condições de derivação

A derivação do DON com HFBI gerou um cromatograma, Figura 2, com poucos picos, além dos esperados, tri-heptafluorobutiril desoxinivalenol (DON-tri-HFB) e do padrão interno (PI). A área relativa ( $\text{Área}_{\text{DON}} / \text{Área}_{\text{PI}}$ ) obtida foi 1,24.

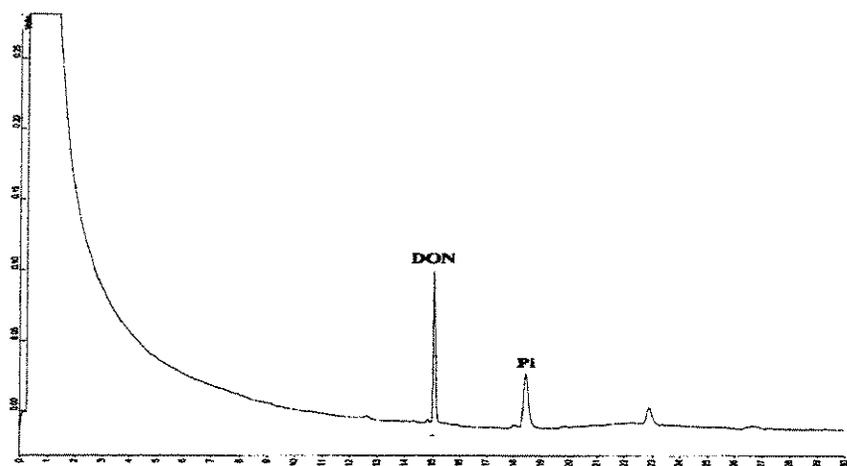
A Figura 3 traz o perfil cromatográfico da derivação do DON com TFAA / NaHCO<sub>3</sub>. O derivado formado foi o tri-trifluoroacetil desoxinivalenol (DON-tri-TFA). Nota-se que o cromatograma resultante apresenta menos picos que o gerado com o HFBI. A reação produz um derivado para o qual o detector apresenta maior sensibilidade, em virtude do aumento da área relativa ( $\text{Área}_{\text{DON}} / \text{Área}_{\text{PI}}$ ). Com este sistema de derivação, a ( $\text{Área}_{\text{DON}} / \text{Área}_{\text{PI}}$ ) obtida foi 1,82.

O cromatograma da Figura 4 refere-se ao derivado formado após a reação do DON com o TFAA/piridina. O composto formado, como anteriormente, foi o DON-tri-TFA. Como mostra a figura, houve um aumento no tamanho do pico da toxina e conseqüentemente da área relativa ( $\text{Área}_{\text{DON}} / \text{Área}_{\text{PI}}$ ), que passou de 1,82 para 2,62. Este aumento proporcionou a utilização de quantidades bem menores de solução padrão dos tricotecenos, aumentando assim a sensibilidade do método. Portanto, em virtude desta vantagem apresentada pelo sistema de derivação TFAA/piridina em comparação com o HFBI, o primeiro foi o sistema escolhido para as derivações dos tricotecenos neste trabalho. A Figura 5 traz o cromatograma dos tricotecenos, estudados neste trabalho, derivados com TFAA/piridina. Infelizmente, nem a reação com HFBI e nem a com TFAA, possibilitaram a obtenção do derivado do NIV. Possivelmente, o padrão desta toxina poderia estar velho ou degradado, pois testes realizados com até 3 horas de derivação não formaram o derivado do nivalenol. A partir destes resultados, o

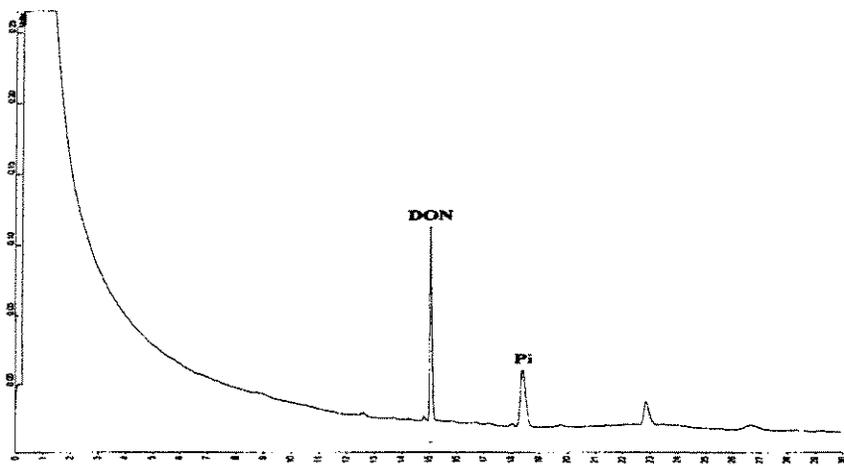
agente de derivação empregado em todos os métodos testados, foi o TFAA em presença de piridina.



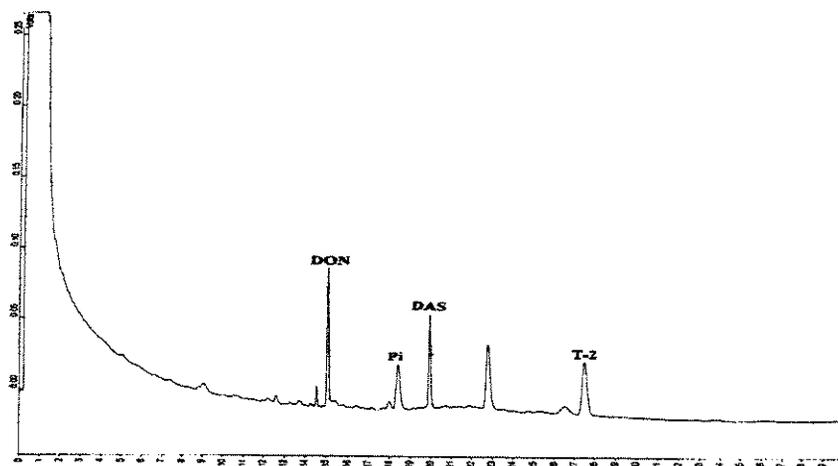
**Figura 2: Perfil cromatográfico da derivação de padrão de DON com HFBI.**



**Figura 3: Perfil cromatográfico da derivação de padrão de DON com TFAA/NaHCO<sub>3</sub>.**



**Figura 4: Perfil cromatográfico da derivação de padrão de DON com TFAA/piridina.**



**Figura 5: Perfil cromatográfico de uma mistura de padrões de DON, DAS e T2 derivados com TFAA / piridina.**

## **2. Avaliação de sistemas de extração e limpeza**

### **2.1. Sistema de extração e limpeza de FURLONG & SOARES (1995)**

Antes de se proceder a análise das amostras de milho pipoca, por este método, descrito no item 7.1, testes para verificar a recuperação proporcionada pela coluna de carvão:alumina:celite (0,7 : 0,5: 0,3) foram realizados com padrão de toxina T2. Após estes testes, executou-se o sistema de extração e limpeza do método com amostras não-contaminadas artificialmente, para verificar a capacidade de limpeza desta coluna para extratos de milho pipoca. Em seguida, extração e limpeza de amostras artificialmente contaminadas foram executadas.

Após a passagem do padrão de toxina T2 pela coluna de carvão:alumina:celite (0,7 : 0,5 : 0,3) e eluição com 40 mL de tolueno:acetonitrila (95:5), sua recuperação foi de apenas 40%. Mesmo trabalhando-se apenas com

solução padrão desta toxina, o cromatograma obtido era extremamente sujo, apresentando diversos picos interferentes.

A Figura 6 traz o perfil cromatográfico de uma amostra de milho pipoca não-contaminada artificialmente. Este teste foi realizado para verificar a capacidade de limpeza da coluna de carvão:alumina:celite. Fica claro pelo cromatograma apresentado, que a coluna não é adequada para a limpeza de extrato de milho. Devido a esta incapacidade de limpar a amostra, por parte desta coluna, as etapas de extração, clarificação e partição do método de FURLONG & SOARES (1995) foram mantidas, mas a coluna de carvão:alumina:celite (0,7: 0,5: 0,3) foi substituída e testes foram realizados com outras combinações de adsorventes.

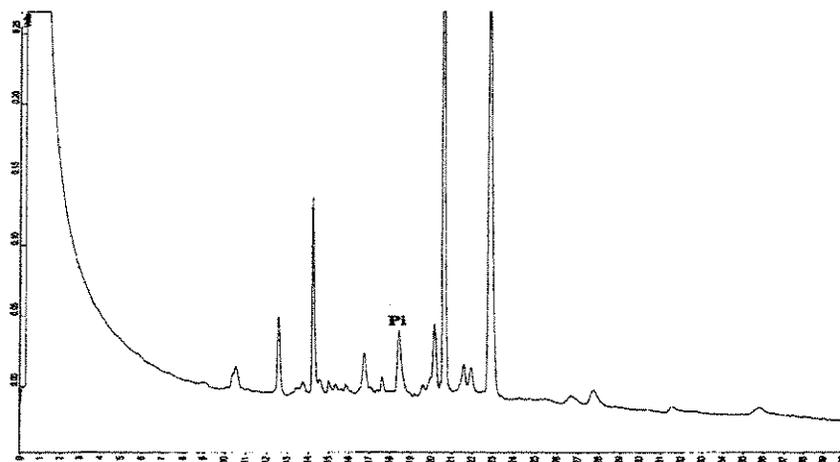


Figura 6: Perfil cromatográfico utilizando o sistema de extração e limpeza descrito por FURLONG & SOARES (1995) em amostra de milho pipoca.

## 2.2. Sistema de extração de FURLONG & SOARES (1995) e limpeza em coluna de Florisil (2g)

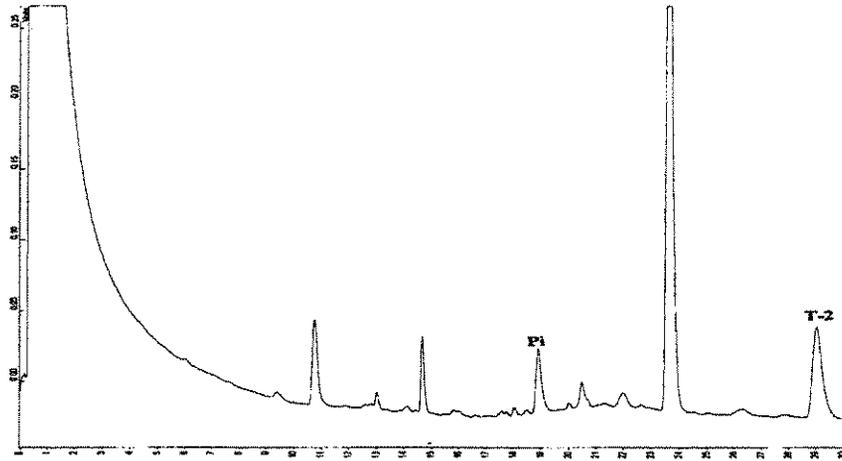
Antes de realizar testes para verificar a capacidade da coluna na limpeza dos extratos de milho pipoca, alguns experimentos com solução padrão de toxina T2 e sistemas de solventes para a eluição foram feitos para verificar qual o melhor sistema de eluição, levando em consideração a recuperação e o perfil cromatográfico obtido.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos com os sistemas de eluição empregados na eluição da toxina T2 da coluna de Florisil (2g).

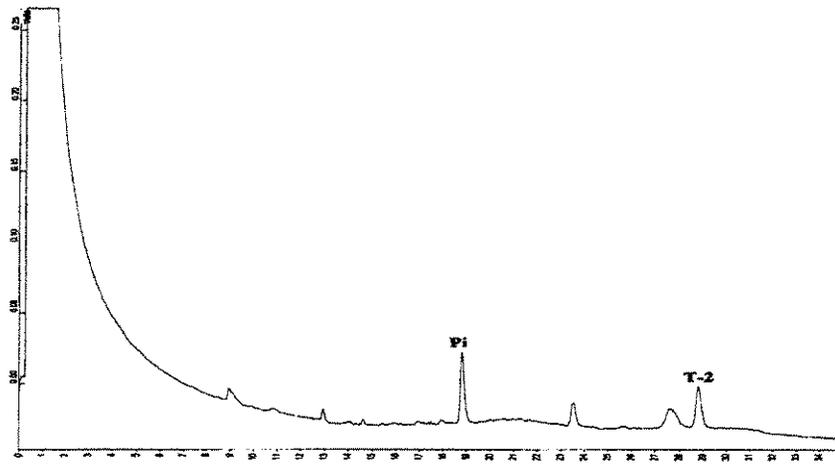
Tabela 3: Sistemas de eluição empregados nos testes com coluna de Florisil (2g).

Sistema de eluição	Recuperação (%)	Perfil cromatográfico
Clorofórmio:metanol (70:30)	85	Limpo com poucos picos interferentes (Figura 7)
Acetonitrila (100)	89	Limpo com poucos picos interferentes (Figura 8)
Acetonitrila:água (84:16)	97	Limpo sem picos interferentes (Figura 9)

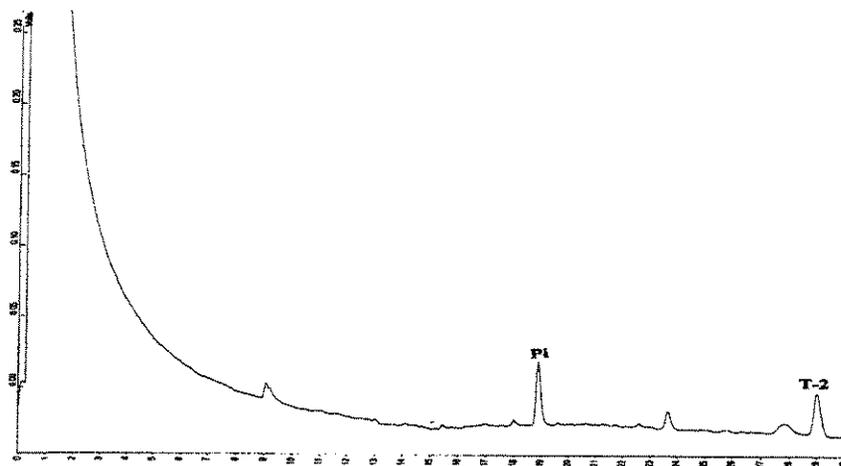
Como o sistema de eluente acetonitrila:água (84:16) possibilitou maior recuperação e cromatograma bastante limpo, este foi o sistema escolhido para proceder a eluição do extrato de milho pipoca não-contaminado artificialmente da coluna Florisil (2g). Como mostra a Figura 10, infelizmente a coluna não possibilitou a retenção dos diversos co-extrativos da amostra. Portanto, apesar da recuperação ser alta com a toxina pura, esta inabilidade na limpeza do extrato de milho pipoca torna sua utilização inviável para este tipo de amostra.



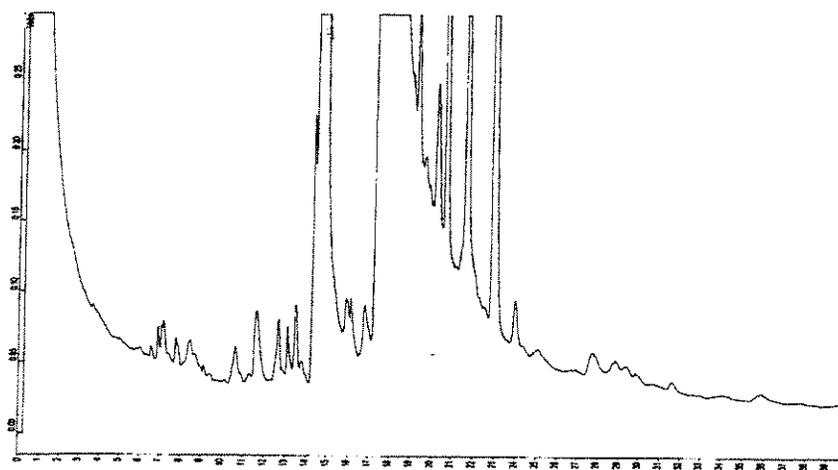
**Figura 7: Perfil cromatográfico do padrão de T2 eluído com clorofórmio:metanol (70:30) em coluna de Florisil (2g).**



**Figura 8: Perfil cromatográfico do padrão de T2 eluído com acetonitrila (100) em coluna de Florisil (2g).**



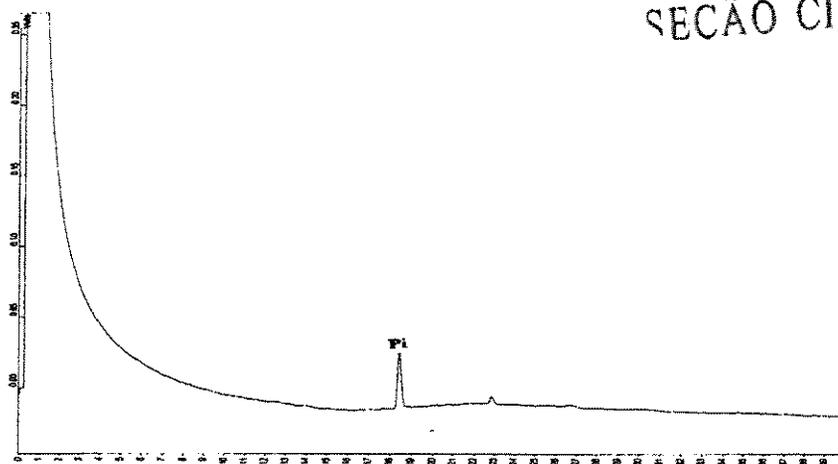
**Figura 9: Perfil cromatográfico do padrão de T2 eluído com acetonitrila:água (84:16) em coluna de Florisil (2g).**



**Figura 10: Perfil cromatográfico utilizando limpeza de extrato de milho pipoca em coluna de Florisil (2g) eluída com acetonitrila:água (84:16).**

**2.3. Sistema de extração descrito por FURLONG & SOARES (1995) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) (ROMER, 1986).**

A Figura 11 refere-se ao cromatograma de um extrato, segundo o método de FURLONG & SOARES (1995), descrito no item 7.1, de milho pipoca não-contaminado artificialmente passado pela coluna de alumina:carvão e eluído com 40 mL de acetonitrila:água (84:16). Como mostra a figura, esta coluna combinada com este eluente proporcionaram uma ótima limpeza do extrato de milho pipoca.

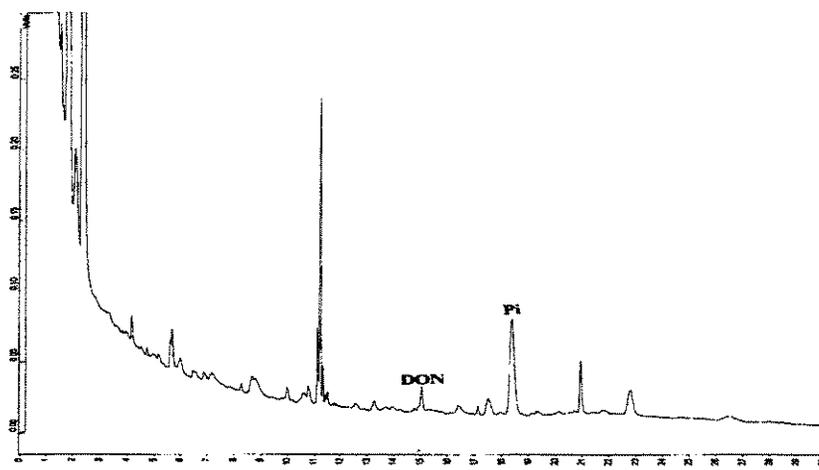


UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SECÇÃO CIRCULANTE

**Figura 11: Perfil cromatográfico utilizando limpeza de extrato de milho pipoca em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) com acetonitrila:água (84:16) como eluente.**

**2.4. Sistema de extração descrito por LANGSETH & CLASEN (1992) combinado com coluna de limpeza de alumina:carvão (2,3:1,9) (ROMER, 1986).**

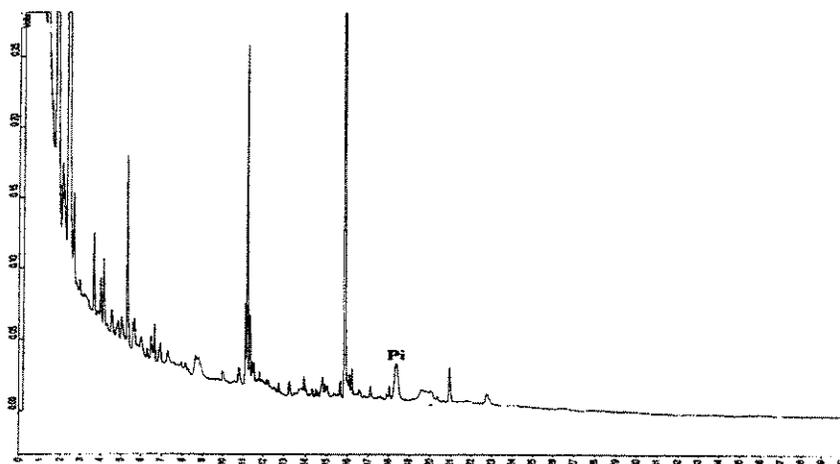
O cromatograma do extrato obtido, de acordo com o método de LANGSETH & CLASEN (1992), está na Figura 12. O extrato inicial era extremamente pigmentado (amarelo) e oleoso. Durante sua concentração, em banho-maria, houve a formação de grânulos amarelos no fundo do béquer utilizado. A ressuspensão deste extrato concentrado, para proceder limpeza em coluna de carvão:alumina e eluição com acetonitrila:água (84:16), não foi completa, pois parte do extrato não se dissolveu nos 5 x 1 mL empregados. Após a passagem pela coluna, o extrato que era inicialmente amarelo tornou-se límpido (transparente). Mas, como mostra a Figura 12, muitos co-extrativos não puderam ser retidos pela coluna. A porcentagem de recuperação foi apenas 20%, para uma amostra fortificada com desoxinivalenol (DON). Apesar da recuperação ser baixa, esta poderia ser melhorada modificando-se as razões entre acetonitrila e água ou mesmo trocando-se estes solventes por outros compatíveis, mas com capacidade de eluição maior. A força de eluição é uma variável que pode influenciar a porcentagem de recuperação. Como os tricotecenos possuem caráter lipofílico, é possível que uma grande parte da toxina tenha sofrido uma interação com os compostos gordurosos do extrato, contribuindo para este baixo valor na recuperação.



**Figura 12: Perfil cromatográfico utilizando o sistema de extração de LANGSETH & CLASEN (1992), limpeza em coluna alumina:carvão (2,3:1,9) e eluição com acetonitrila:água (84:16).**

### **2.5. Sistema de extração descrito por TANAKA (1985) combinado com coluna de limpeza de alumina:carvão (2,3:1,9) (ROMER, 1986).**

O método de TANAKA (1985) também foi empregado para proceder extração de milho pipoca contaminado artificialmente com DON. O extrato obtido apresentou-se extremamente amarelo e, apesar da etapa de desengorduramento, gorduroso. Durante a concentração do extrato, houve a formação de uma película muito espessa no fundo do frasco utilizado. Na etapa de ressuspensão deste extrato, antes de se passar pela coluna de carvão:alumina, a película não se dissolveu, portanto nem toda a mostra foi possível de ser colocada na coluna. Apesar disto, a eluição com 40 mL de acetonitrila:água (84:16), possibilitou a obtenção de um eluato transparente. Mas como mostra a Figura 13, a coluna não conseguiu reter a maioria dos compostos co-extraídos. Não foi possível calcular a porcentagem de recuperação, pois o pico do DON não estava resolvido.



**Figura 13: Perfil cromatográfico utilizando sistema de extração de TANAKA (1985), limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) e eluição com acetonitrila:água (84:16).**

Diante dos problemas apresentados por ambos os métodos, LANGSETH & CLASEN (1992) e TANAKA (1985), optou-se por empregar o sistema de extração descrito por FURLONG & SOARES (1995) e limpeza em coluna de carvão:alumina (1,9:2,3) eluída com acetonitrila:água (84:16) para proceder a análise de amostras de milho pipoca.

Não se havia procedido a extração, pelo método de FURLONG & SOARES (1995), de tricotecenos de amostras de milho pipoca contaminadas artificialmente. A partir do momento que se iniciou a fortificação das amostras com DON e os procedimentos de extração, problemas com a recuperação começaram a ocorrer. Na realidade, a recuperação desta toxina estava sendo muito baixa, entre 24 e 33%.

Para encontrar a etapa crítica do método (FURLONG & SOARES, 1995), ou seja, a etapa que provocava perda de toxina, todas as etapas do método foram analisadas separadamente. Os testes foram realizados sem a presença de matriz (milho), apenas com solução padrão de desoxinivalenol.

O problema foi identificado na etapa de partição com clorofórmio. A princípio desconfiou-se da qualidade do clorofórmio que estava sendo empregado, mas testes com outras quatro marcas deste solvente deram praticamente os mesmos resultados.

Portanto, como ainda não se havia encontrado um sistema de extração e limpeza que proporcionasse recuperação adequada e limpeza eficiente, outros métodos foram testados. Um deles constou da utilização de colunas com resinas trocadoras de cátions combinadas com carvão e alumina. Outros solventes de extração também foram testados, entre eles acetonitrila e água em algumas proporções. Tais métodos estão descritos nos itens a seguir.

#### **2.6. Sistema de extração de limpeza descrito LAUREN & GREENHALGH (1987)**

Para este método a amostra foi extraída com acetonitrila: água (85:15) por 2 horas em shaker. O extrato era filtrado e concentrado a 80°C em banho de água. Após a concentração, o extrato foi passado por uma coluna de limpeza. Este método empregou uma coluna que continha os seguintes adsorventes: 1g alumina:carvão (misturados na proporção de 20 partes de alumina e 1 parte de carvão) e 2g de resina trocadora de cátions empacotados em camadas sucessivas. Para este método, três tipos de resina trocadora de cátions (Amberlite IR-120, IRP-64 e CG-50) foram empregados nas montagens das colunas. Após o empacotamento das colunas, estas foram lavadas com 15 mL do eluente acetonitrila:água (85:15). Em seguida, o extrato foi colocado e eluído com 40mL de acetonitrila: água (85:15).

Experimentos, para verificar o quanto cada coluna retinha de toxina, foram realizados empregando-se padrão puro de toxina T-2 em cada uma das colunas. Para a verificar a recuperação, foi feita a extração de amostras contaminadas artificialmente.

Os extratos iniciais mostraram-se extremamente amarelados. Após a concentração dos mesmos, estes se tornaram muito viscosos. A presença de gordura era visível.

Todas as colunas precisaram ser eluídas sob vácuo, em virtude da granulometria tanto do carvão (100-400 mesh) como das resinas Amberlite IRP-64 (100-400 mesh) e CG-50 (100-200 mesh).

Após a passagem dos extratos pelas colunas estes se tornaram límpidos (transparentes), mas notou-se a presença de algumas partículas de carvão nos eluatos. Este foi outro problema ocasionado pela granulometria do carvão. Os extratos limpos foram então concentrados em banho de água a 80°C. Após a secagem, percebeu-se a presença de material viscoso amarelado no fundo e nas paredes dos frascos. A quantidade deste material viscoso era bem maior nos extratos passados pelas colunas compostas pelas resinas IRP-64 e CG-50, quando comparada com a quantidade apresentada no extrato eluído pela resina Amberlite IR-120.

Como mostram as Figuras 14, 15 e 16, nenhuma coluna conseguiu limpar os extratos das amostras. Em virtude da inadequação da limpeza, por parte das colunas, não foi possível o cálculo de recuperação do método para as amostras contaminadas artificialmente, pois o pico da toxina T-2, utilizada para testar a limpeza, não foi detectado.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

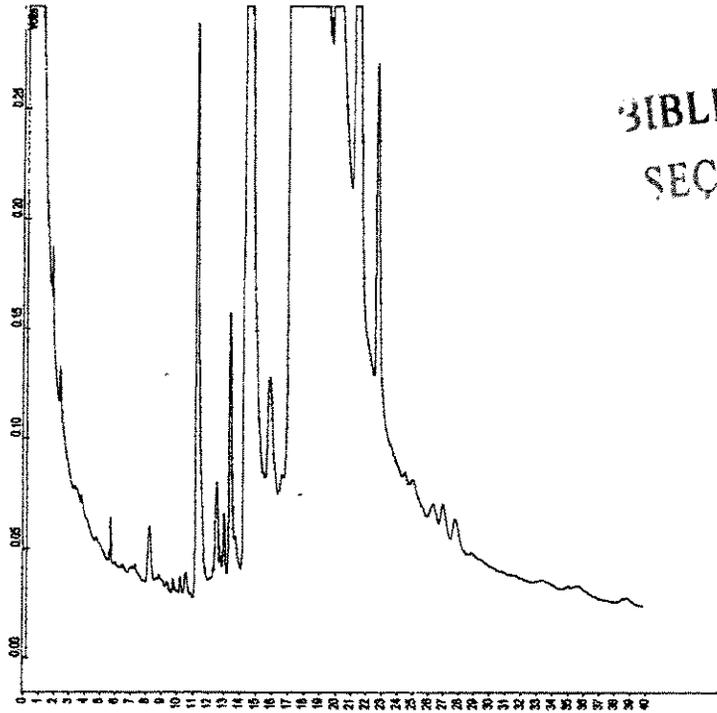
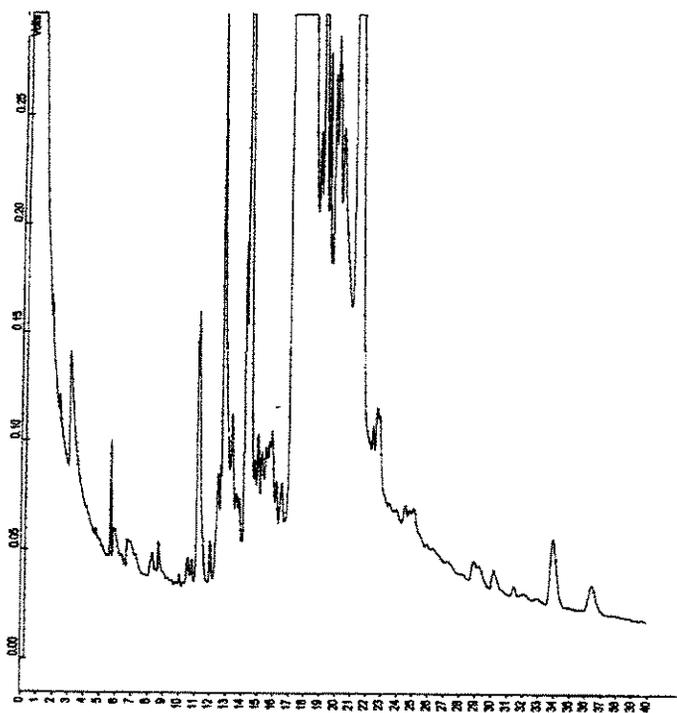
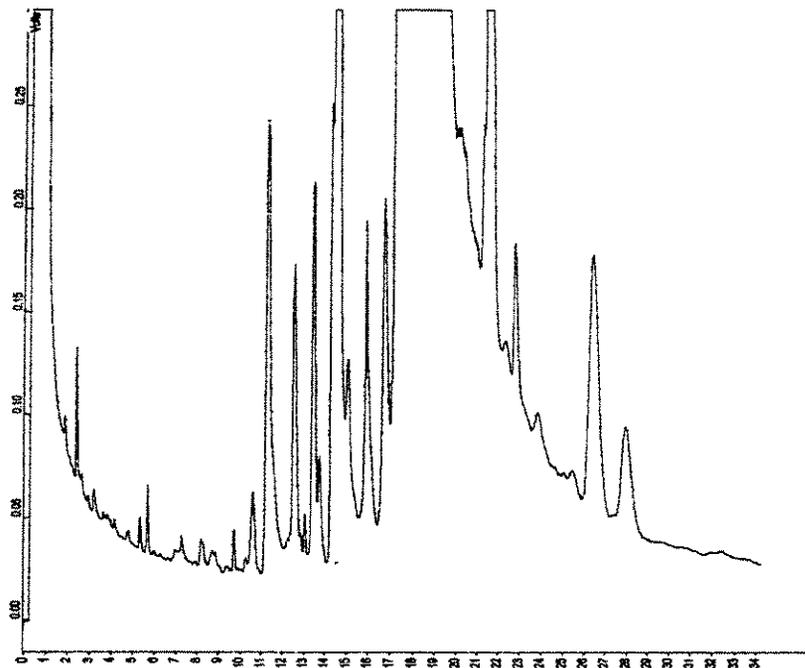


Figura 14: Amostra de milho pipoca contaminada artificialmente, limpa em coluna de 1g de alumina:carvão (20+1) e 2g de resina IRP-64.



**Figura 15: Amostra de milho pipoca contaminada artificialmente, limpa em coluna de 1g de alumina:carvão (20+1) e 2g de resina CG-50.**



**Figura 16: Amostra de milho pipoca contaminada artificialmente limpa, em coluna de alumina:carvão (20+1) e 2g de resina IR-120.**

Os testes realizados com padrão de toxina T2 puro nas colunas, para a verificar o quanto cada coluna retinha de toxina, resultaram em baixas porcentagens de recuperação. A coluna que continha a resina Amberlite IR-120 reteve 37% da toxina, já as resinas Amberlite IRP-64 e CG-50 retiveram 83% e 77% respectivamente.

A incapacidade das resinas IRP-64 e CG-50 de limparem os extratos de milho juntamente com a alta retenção da toxina T-2, mostrou que o emprego destas resinas em colunas de limpeza era inviável para este tipo de amostra.

Apesar da coluna composta pela resina Amberlite IR-120 também não ter possibilitado a limpeza dos extratos, decidiu-se realizar mais alguns testes com esta coluna, pois esta apresentou melhor recuperação da toxina T-2.

Como dito anteriormente, o extrato final seco apresentou um material viscoso, tanto no fundo como nas paredes dos frascos. Com o intuito de se eliminar este material, algumas alterações foram realizadas: a) troca da granulometria de carvão, de 100-400mesh para 60 mesh, a fim de se eliminar a presença de partículas de carvão nos extratos e a utilização de vácuo; b) mudança nas proporções entre adsorventes, a coluna empregada passou a conter 2,3g de alumina, 1,9g de carvão e 2g de resina Amberlite IR-120; c) adição de uma etapa de desengorduramento com n-hexano; d) aumento no volume de eluente de 40 para 100 mL, com o objetivo de melhorar a porcentagem de recuperação.

## **2.7. Sistema de extração LAUREN & GREENHALGH (1987) e limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0)**

As amostras contaminadas artificialmente foram extraídas com acetonitrila: água (85:15), segundo o método de LAUREN & GREENHALGH (1987). Uma alíquota do extrato foi desengordurada com n-hexano. Este extrato desengordurado foi, então, seco em banho de água a 80°C.

Nesta etapa, o sistema de solventes para a eluição das colunas, acetonitrila:água, foi testado nas proporções (84:16) e (75: 25). Os extratos secos, foram re-dissolvidos em cada um destes eluentes, passados pela coluna composta por alumina:carvão:resina (2,3: 1,9: 2,0) e eluídos com 100 mL dos eluentes já citados . Após a eluição, os extratos foram secos em banho de água a 80°C. Os resíduos secos foram submetidos à derivação com TFAA-piridina e injetados em cromatógrafo à gás.

Os extratos iniciais, obtidos a partir da extração com acetonitrila:água (85:15) mostraram-se extremamente amarelados. Depois de serem secos a 80°C, apresentaram-se muito viscosos e pareciam bastante gordurosos, apesar da etapa de desengorduramento. A ressuspensão destes, antes da passagem pela coluna de limpeza, foi bastante complicada. Após a passagem dos extratos pela coluna

de limpeza e eluição com acetonitrila:água (84:16) e (75:25), estes se tornaram límpidos. Mas, quando foram secos, novamente, em banho de água a 80°C, um material viscoso e levemente amarelado tornou-se visível em ambos os eluatos. A quantidade deste material foi bem maior no extrato obtido da eluição com acetonitrila:água (75:25). Mesmo assim ambos os extratos foram derivados com TFAA-piridina e injetados em cromatógrafo à gás.

A Figura 17 traz o cromatograma da eluição feita com acetonitrila:água (84:16). Este cromatograma está relativamente limpo, mostrando que a coluna conseguiu reter a maior parte dos interferentes. Mas, a recuperação desta coluna foi de apenas 23% para a toxina T2.

O cromatograma obtido a partir da eluição acetonitrila:água (75:25) está na Figura 18. Este cromatograma está ligeiramente mais sujo que o da Figura 17 e percebe-se uma grande diminuição no pico do padrão interno. Além disso, não foi possível o cálculo da recuperação, pois o pico da toxina T-2 (Figura 18) nem foi detectado. Uma das prováveis causas desta diminuição no pico do padrão interno, é a presença de gordura no derivado final. O padrão interno (metil araquidato) por se tratar de um éster de ácido graxo, pode ter apresentado grande afinidade por este material viscoso, que provavelmente era gordura e, não se dissolveu em n-hexano antes de ser injetado no cromatógrafo. A toxina também deve ter sofrido o mesmo tipo de afinidade ou oclusão por este material viscoso.

O aumento no volume de eluente de 40 para 100mL não aumentou a recuperação da toxina pura aplicada diretamente nas colunas. As recuperações foram 89% para eluição com acetonitrila:água (84:16) e 58% para acetonitrila:água (75:25).

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

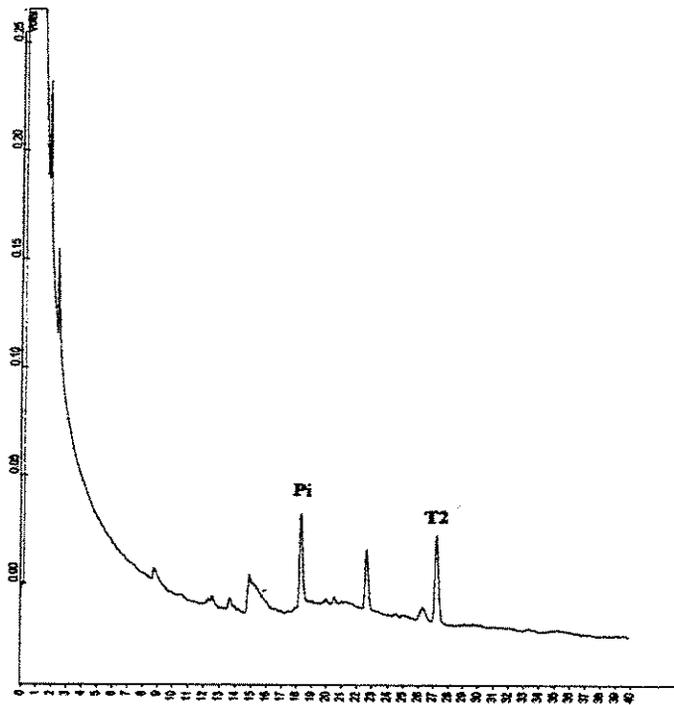
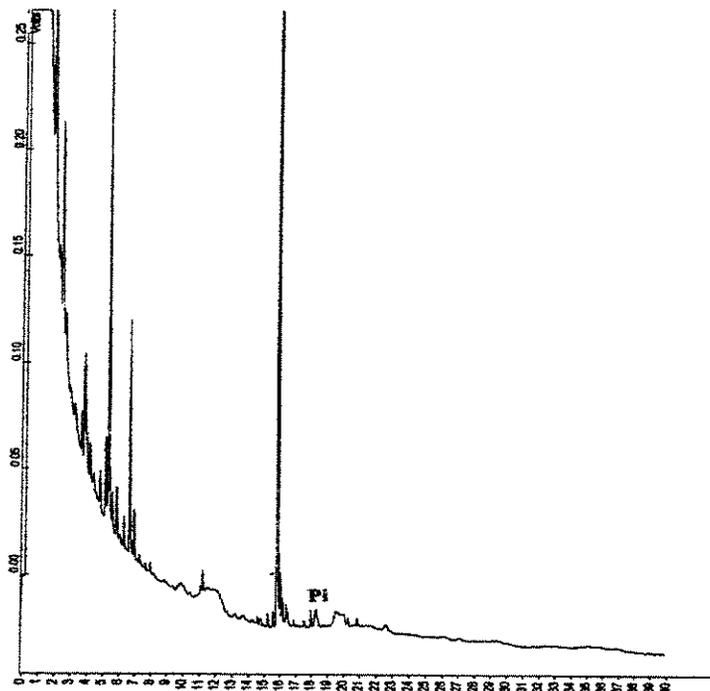


Figura 17: Amostra de milho contaminada artificialmente com toxina T2 (1 $\mu$ g/g), limpa em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0), eluída com acetonitrila:água (84:16).



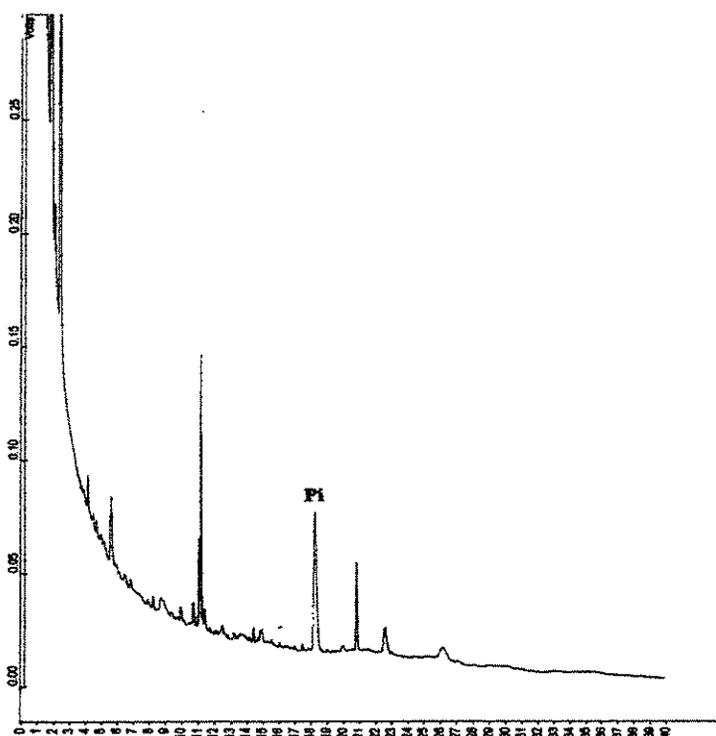
**Figura 18:** Amostra de milho pipoca contaminada artificialmente com toxina T2 (1 $\mu$ g/g), limpa em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0), eluída com acetonitrila:água (75:25).

### **2.8. Sistema de extração descrito por LANGSETH & CLASEN (1992) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0) e eluição com acetonitrila:água (84:16)**

Com o objetivo de desengordurar a amostra, previamente à extração, foi introduzida uma etapa de desengorduramento por extrator de Goldfish por 3 horas. A seguir as amostras foram extraídas segundo o método de LANGSETH & CLASEN (1992), item 7.4, eluídas com acetonitrila:água (84:16) da coluna alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3: 1,9: 2,0). Para verificar se a resina trocadora de cátions realmente melhorava a limpeza dos extratos, a coluna alumina:carvão (2,3: 1,9) foi empregada paralelamente na limpeza das amostras extraídas por este método.

Após a concentração do extrato houve a formação de uma quantidade pequena de grânulos amarelos no fundo do béquer, mas estes grânulos foram facilmente dissolvidos. Não foram necessários mais que 4mL de acetonitrila:água (84:16) para a remoção total da amostra e transferência para as colunas em teste. Depois da concentração dos eluatos a 80°C, houve a formação de material viscoso esbranquiçado, mas em pequena quantidade.

Até este ponto do trabalho, não se tinha analisado amostras contaminadas artificialmente, pois se optou por verificar, primeiramente, a capacidade de limpeza das colunas. Um novo teste foi realizado, empregando o desengorduramento de amostras de milho por 3 horas em Goldfish. A seguir a amostra foi enriquecida com padrão de toxina T2. A extração foi realizada segundo o método de LANGSETH & CLASEN (1992). Os extratos foram concentrados e passados, separadamente, pelas colunas de alumina:carvão:resina (2,3:1,9:2,0) e alumina:carvão (2,3:1,9), e eluídos com acetonitrila:água (84:16) de cada uma das colunas. O cromatograma resultante da limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0) e eluição com acetonitrila:água (84:16) estava relativamente limpo como mostra a Figura 19. Mas a recuperação da toxina T2 foi menor que 20% nesta coluna. A recuperação proporcionada pela limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) e eluição com acetonitrila:água (84:16) também foi baixa, menor 30%.



**Figura 19:** Amostra artificialmente contaminada, desengordurada por Goldfish, extraída segundo o método de LANGSETH & CLASEN (1992), limpa em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0) e eluída com acetonitrila:água (84:16).

**2.9. Sistema de extração descrito por TANAKA (1985) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 ( 2,3 : 1,9: 2,0) e eluição com acetonitrila:água (3:1)**

Com o objetivo de desengordurar a amostra, previamente à extração, foi introduzida uma etapa de desengorduramento por extrator de Goldfish por 3 horas. A seguir as amostras foram extraídas segundo o método de TANAKA (1985), item 7.5, eluídas com acetonitrila:água (3:1) da coluna alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3: 1,9: 2,0). Para verificar se a resina trocadora de cátions realmente melhorava a limpeza dos extratos, a coluna alumina:carvão (2,3: 1,9) foi empregada paralelamente na limpeza das amostras extraídas por este método.

Após a concentração do extrato até cerca de 2mL, houve a formação de grânulos amarelos (provavelmente mistura de gordura, pigmentos e proteínas) no fundo e nas paredes do béquer. Foram necessárias diversas lavagens com acetonitrila:água (3:1) para a retirada total da amostra no béquer, cerca de 10 mL foram utilizados. Após a aplicação dos extratos, separadamente, nas colunas de alumina:carvão (2,3 : 1,9) e alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3: 1,9: 2,0) e eluição com acetonitrila:água (3:1), estes se tornaram límpidos (transparentes). Mas, após a concentração do eluato a 80°C, houve o aparecimento de material viscoso levemente amarelado em ambos os eluatos.

Como mostra a Figura 20, o cromatograma é limpo, mas o pico do padrão interno (Pi) sofreu uma grande diminuição em sua área, o que mostra que este teve mais afinidade pelo material viscoso e pode não ter dissolvido no n-hexano. Este comportamento foi o mesmo, tanto para o extrato passado pela coluna de alumina:carvão (2,3: 1,9), como o pelo passado pela coluna de alumina:carvão:resina (2,3: 1,9: 2,0). Os cromatogramas obtidos foram praticamente iguais. Em virtude dos problemas encontrados desde a demora na concentração dos extratos (25% de água) até o aumento na quantidade de material viscoso, este sistema de solventes, acetonitrila:água (3:1), foi eliminado.

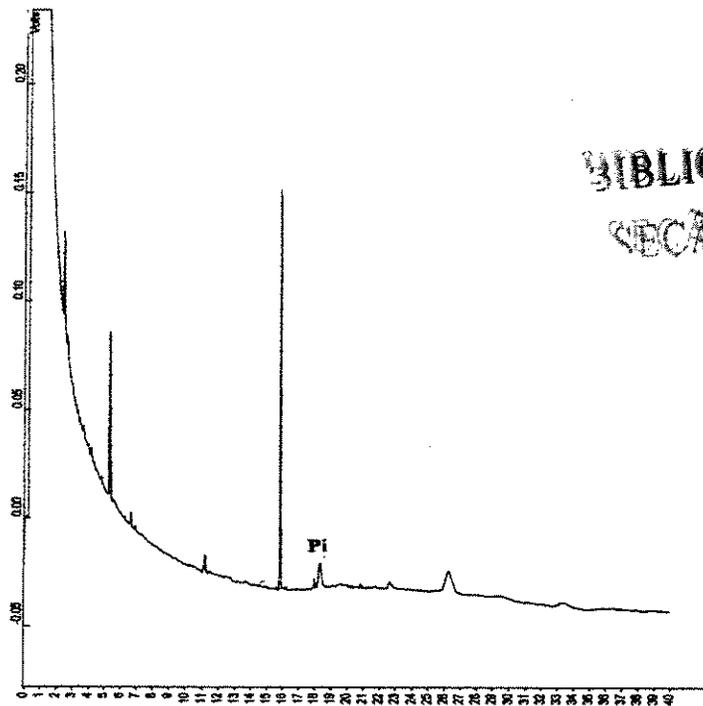


Figura 20: Amostra não enriquecida, desengordurada por Goldfish, extraída segundo o método de TANAKA (1985), limpa em coluna de alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3:1,9:2,0) e eluída com acetonitrila:água (3:1).

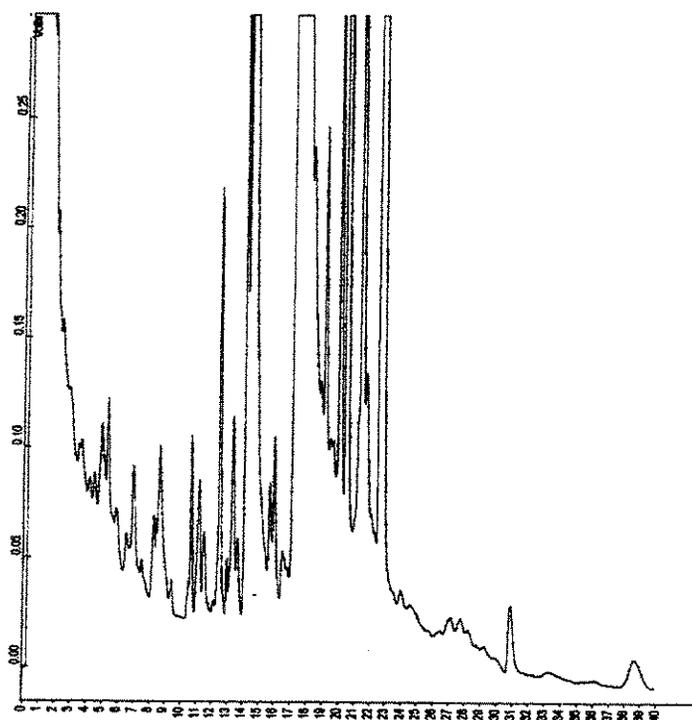
Outro sistema de eluição testado foi o com tolueno:acetonitrila (95:5), pois este é o sistema empregado por FURLONG & SOARES (1995). Este não gerou extrato com material viscoso. A recuperação de toxina T-2, para amostras contaminadas artificialmente, foi menor que 25% para ambas as colunas, alumina:carvão (2,3:1,9) e alumina:carvão:resina Amberlite IR-120 (2,3: 1,9: 2,0).

Considerando os resultados obtidos, notou-se que a resina trocadora de cátions não melhorava a limpeza das amostras, além de proporcionar recuperação menor, portanto a resina trocadora de cátions foi eliminada da composição das colunas. Como os sistemas de extração e limpeza com acetonitrila:água (84:16) e (3:1) também não geraram resultados satisfatórios, foi descartada a utilização destes sistemas. Outros métodos foram então testados.

## **2.10. Sistema de extração e limpeza descrito por ROSEN & ROSEN (1984)**

Este método consistiu primeiramente de extração com metanol. O extrato foi desengordurado com n-hexano e seco a 60°C em banho-maria. Foi redissolvido em solução de 20% de metanol em água e passado por uma coluna de extração em fase sólida (SPE) de C<sub>18</sub> (Varian, Bond Elut). O extrato foi eluído com metanol:água (85:15) e o eluato seco novamente a 60°C. O resíduo foi redissolvido e eluído com tolueno: acetato de etila (1:1) e aplicado em coluna (SPE) de sílica gel fase normal. Este último eluato foi seco a temperatura ambiente sob fluxo de nitrogênio. Os extratos finais foram derivados com TFAA-piridina e injetados em cromatógrafo gasoso.

Para este método só foram empregadas amostras não contaminadas, pois antes de se proceder a experimentos de recuperação, preferiu-se verificar se as colunas, C<sub>18</sub> e sílica gel, tinham capacidade de limpar os extratos de milho. Infelizmente, como mostra a Figura 21, este método é inviável, pois as colunas não conseguiram limpar os extratos de milho.



**Figura 21: Amostra não enriquecida extraída e limpa segundo o método descrito por ROSEN & ROSEN (1984).**

### **2.11. Sistema de extração, clarificação e partição de SCOTT *et al.* (1981) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3 : 1,9)**

Este sistema constou da extração com metanol:água (1:1), clarificação sulfato de amônio 30% e partição com acetato de etila (100). A limpeza dos extratos foi feita em coluna de alumina:carvão (2,3 : 1,9) (ROMER, 1986) e a eluição com 40 mL de tolueno:acetona (95:5), pois este foi o sistema de solventes empregado pelo método de SCOTT *et al.* (1981).

Foi realizada a extração de amostra contaminada artificialmente com toxina T2. O padrão puro também foi passado pela coluna com eluição com tolueno:acetona (95:5), para verificar a capacidade de eluição deste sistema de solventes.

O extrato obtido mostrou-se limpo, mas como mostra a Figura 22, existem alguns interferentes, principalmente na região do pico do desoxinivalenol, ainda no derivado final. A recuperação da toxina colocada diretamente na coluna foi nula, o que demonstra que o sistema de solventes não tem capacidade de eluir a toxina da coluna empregada. O mesmo resultado foi observado para amostra contaminada artificialmente.

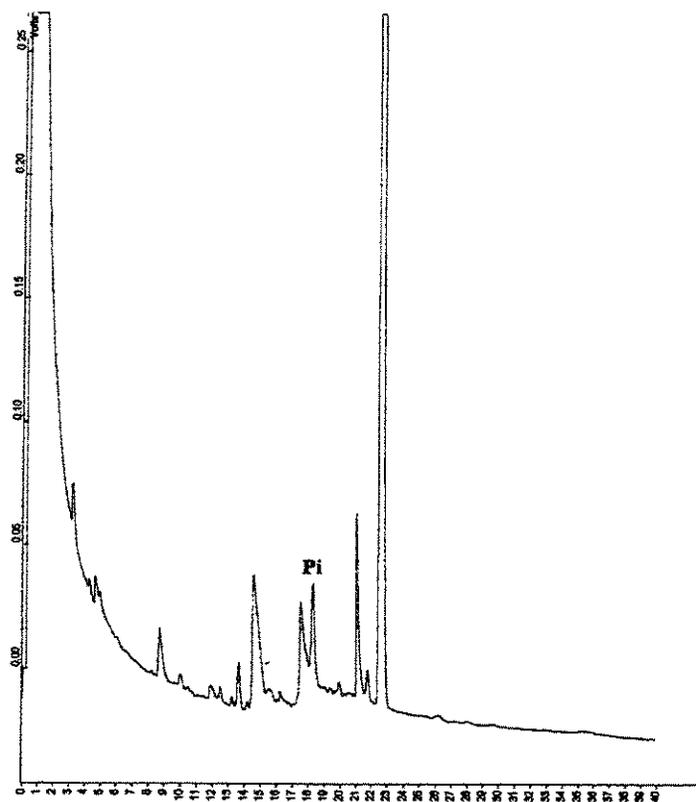


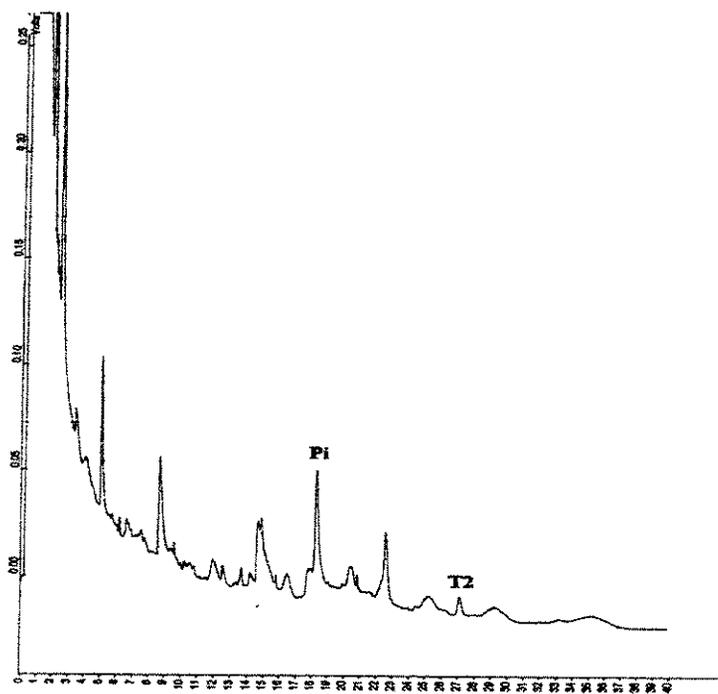
Figura 22: Amostra contaminada artificialmente extraída segundo o método descrito por SCOTT *et al.* (1981), passada por coluna de limpeza de alumina:carvão (2,3:1,9) e eluída com tolueno:acetona (95:5).

**2.12. Sistema de extração e clarificação do método de SCOTT *et al.* (1986) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3: 1,9).**

Somente o sistema de extração deste método foi empregado. A extração foi realizada com metanol:água (7:3) seguida de clarificação com sulfato de amônio 10% e celite. Uma alíquota do extrato foi seca e aplicada em coluna alumina:carvão (2,3 : 1,9) e eluído com 40 mL de acetato de etila (100).

Como no item anterior, procedeu-se a aplicação de padrão puro de toxina T2 na coluna, para verificar a capacidade de eluição do acetato de etila. Amostras contaminadas artificialmente também foram analisadas.

O extrato obtido por este método mostrou-se limpo, mas a no derivado final ainda exibiu alguns interferentes, como mostra o cromatograma da Figura 23. A recuperação para amostra artificialmente contaminada e da toxina aplicada diretamente na coluna foi menor que 15%.



**Figura 23: Amostra contaminada artificialmente extraída segundo o método descrito por SCOTT *et al.* (1986), passada por coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) e eluída com acetato de etila.**

### **2.13. Sistema de extração de método FURLONG & SOARES (1995), com partição com diclorometano e limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3:1,9)**

Após a execução de todos os métodos já descritos e nenhum ter gerado resultados satisfatórios, decidiu-se insistir no método de FURLONG & SOARES (1995) por se tratar de um método desenvolvido em laboratório nacional.

Uma modificação foi feita na etapa de partição. Trocou-se o clorofórmio, empregado no método original, por diclorometano (cloreto de metileno). Este último solvente vem sendo empregado por BARAJ *et al.* (1999) na determinação tricotecenos em cevada e produtos derivados.

A modificação foi testada com padrões dos tricotecenos desoxinivalenol (DON), toxina T2 (T-2) e diacetoxiscirpenol (DAS) sem matriz. Após a partição, limpeza em coluna de alumina:carvão (2,3: 1,9) e eluição com acetonitrila:água (84:16), os padrões foram derivados com TFAA/piridina e injetados em cromatógrafo gasoso.

Nos testes realizados, em triplicata, com padrões de tricotecenos, sem matriz, as recuperações variaram de 87 a 93% para desoxinivalenol, de 92 a 98% para diacetoxiscirpenol e de 94 a 98% para a toxina T2.

Como as recuperações obtidas nos testes, apenas com padrão, geraram resultados promissores, efetuou-se a extração de amostras de milho contaminadas artificialmente. Nos experimentos realizados em 5 replicatas, com amostras contaminadas artificialmente, no nível de 0,5µg/g de cada tricoteceno, as recuperações variaram de 61 a 80 % para o desoxinivalenol, de 79 a 95% para o diacetoxiscirpenol e de 75 a 93% para a toxina T2.

### 3. Validação da metodologia escolhida

A recuperação e a repetibilidade foram testadas em amostras artificialmente contaminadas com 0,5µg/g de cada tricoteceno (DON, DAS, T2). As amostras, assim contaminadas, foram extraídas e clarificadas de acordo com o item 7.10, passadas pela coluna de alumina:carvão (2,3: 1,9), eluídas com acetonitrila:água (84:16) e derivadas com TFAA-piridina. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos após 18 repetições.

Tabela 4: Valores de recuperação (%) para DON, DAS e T2 das amostras controle

	<b>DON</b>	<b>DAS</b>	<b>T2</b>
	61,0	79,0	75,0
	74,3	95,0	93,0
	78,4	90,5	87,7
	80,0	83,7	81,6
	65,7	88,1	78,8
	78,3	92,3	89,7
	66,3	84,1	92,5
	71,9	87,9	82,3
	65,2	94,7	81,9
	73,8	82,3	84,8
	67,0	81,9	94,4
	77,1	95,4	90,3
	61,2	93,8	85,7
	73,9	81,7	83,9
	63,7	86,2	82,5
	74,8	87,1	93,1
	82,1	95,0	92,5
	82,0	95,1	91,8
<b>Média</b>	<b>72,0</b>	<b>88,0</b>	<b>87,0</b>

A repetibilidade do método mostrou-se adequada com desvios padrão relativos (RSD) de 9,8% para DON, 6,3% para DAS e 6,6% para a T2.

As curvas de calibração do DON, da T2 e do DAS estão nas Figuras 24, 25 e 26 respectivamente. As curvas padrão para DON, DAS e T2 foram lineares de 10 a 65 ng/ $\mu$ L, de 10 a 65 ng/ $\mu$ L e de 10 a 85 ng/ $\mu$ L respectivamente.

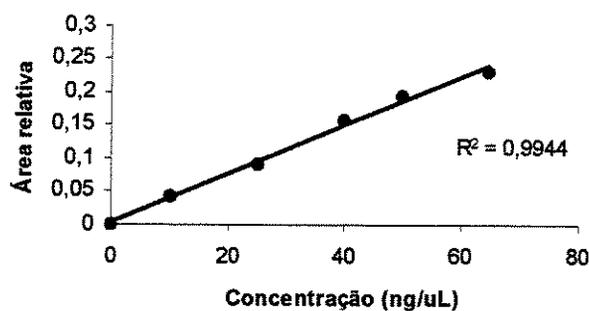


Figura 24: Curva de calibração do Desoxinivalenol.

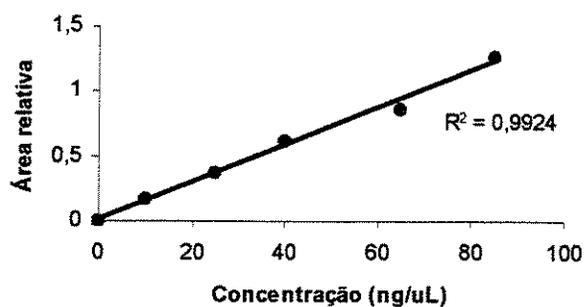


Figura 25: Curva de calibração da Toxina T2.

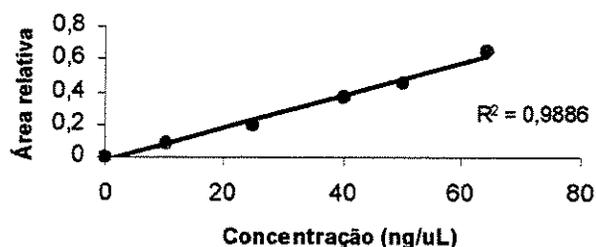


Figura 26: Curva de calibração do Diacetoxiscirpenol.

Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados de acordo com as recomendações da “AMERICAN CHEMICAL SOCIETY” (1980). Uma amostra, não contaminada artificialmente, foi fortificada com padrão dos tricotecenos (DON, DAS e T2), derivada com TFAA-piridina e injetada 5 vezes no cromatógrafo gasoso. O desvio padrão (SD) destas injeções foi então calculado.

O limite de detecção de cada tricoteceno foi determinado com sendo a menor quantidade que gerasse um sinal três vezes maior que o ruído. O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração que produzisse um sinal cinco vezes maior que o limite de detecção. Os resultados obtidos estão na Tabela 5.

Tabela 5: Limite de detecção e quantificação do método

<i>Micotoxina</i>	<i>Limite de detecção (ng/g)</i>	<i>Limite de quantificação (ng/g)</i>
DON	30	150
DAS	50	250
T2	40	200

## CONCLUSÕES

O método escolhido para a determinação de DON, DAS e T2 em milho pipoca foi FURLONG & SOARES (1995) com as modificações necessárias citadas a seguir.

Homogeneizar cinqüenta gramas de amostra com 270 mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4% por 5 minutos em liquidificador. Filtrar, tomar uma alíquota de 150 mL e proceder a clarificação com 150 mL de sulfato de amônio 30%. Novamente tomar uma alíquota de 150 mL e colocar em um funil de separação já contendo 150 mL de água destilada. Realizar a partição, lentamente por 3 minutos, com 15 mL de diclorometano. Deixar em repouso por 10 minutos e recolher toda a fase orgânica em um béquer de 50 mL. Proceder novamente a partição e recolher a fase orgânica no mesmo béquer anterior. Agitar por 20 segundo em ultra-som para homogeneizar os extratos. Tomar uma alíquota de 15mL secar em banho de água a 50°C e proceder a etapa de limpeza. O volume restante (extrato B) secar e guardar (a -18°C) para realizar reações de confirmação de identidade quando a amostra estiver contaminada.

Para limpar o extrato A seco, dissolvê-lo com 5 X 1 mL de acetonitrila:água ( 84:16) e aplicá-lo na coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) (ROMER, 1986), previamente condicionada com 15 mL de acetonitrila:água (84:16). Eluir a amostra com 40 mL de acetonitrila:água (84:16) a uma vazão de 1 mL/min. Concentrar o eluato, em banho de água a 80°C, até cerca de 2 mL e transferi-lo quantitativamente para frasco de reação de 4 mL e secá-lo

Ao extrato seco adicionar 1 mL de solução de 1,5 mg/mL de piridina em tolueno:acetonitrila (95:5) e 200µL de TFAA. Levar a banho de água a 60°C por 60 minutos. Deixar esfriar a temperatura ambiente, adicionar 1 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5% e agitar por 30 segundos em ultra-som. Tomar uma alíquota de 850µL e colocá-la em um segundo frasco contendo 1 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5% e agitar

novamente. Tomar uma alíquota de 650µL e juntá-la ao padrão interno (3µg) em um terceiro frasco. Secar a 50°C sob leve fluxo de N<sub>2</sub>. Ressuspender com 100µL de n-hexano (grau cromatográfico) e analisados por cromatografia gasosa.

Os tricotecenos foram separados e quantificados em cromatógrafo gasoso sob as seguintes condições: temperatura injetor (275°C), temperatura do detector (300°C), programação da coluna (100°C/1min, 6°C/min até 220°C/20min), vazão do gás de arraste (3,6 mL/min) e fluxo de limpeza do injetor (50 mL/min). O volume de injeção foi 1µL, o modo de injeção *splitless* e o tempo de início para a purga (0,75 min).

As curvas padrão para DON, DAS e T2 foram lineares de 10 a 65 ng/µL, de 10 a 65 ng/µL e de 10 a 85 ng/µL respectivamente. Os limites de detecção foram 30 ng/g para DON, 50 ng/g para DAS e 40 ng/g para T2. As médias de recuperação foram 72 % para o DON, 88 % para o DAS e 87 % para a T2.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. **Analytical Chemistry**, 52, n. 14, p. 2242-2249, 1980.

BARAJ, E.K; PADILHA, M.E. & FURLONG, E.B. Determinação simultânea de desoxinivalenol e toxina T2 em cevada e seus derivados. Livro de Programas e Resumos do III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 1999.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

- CROTEAU, S. M., PRELUSKY, D. B., TRENHOLM, H. L. Analysis of trichothecenes mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 4 , p. 928-933, 1994.
- FURLONG, E. B., SOARES, L .M. V. Gas chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists International**, v. 78, n. 2, p. 386-390, 1995.
- JACOBSEN, B. J., BOWEN, K. L., SHELBY, R. A., DIENER, U. L. KEMPPAINEN, B. W., FLOYD, J. Mycotoxins and mycotoxicoses. **Alabama Cooperative Extention System**. Circular ANR-767, 02/93.
- KOTAL, F., HOLADOVÁ, K., HAJŠLOVÁ, J., POUŠTKA, J., RADOVÁ, Z. Determination of trichothecenes in cereals. **Journal of Chromatography A**, v. 830, n. 1, p. 219-225, 1999.
- LANGSETH, W., CLASEN, P. E. Automation of a clean-up procedure for determination of trichothecenes in cereals using a charcoal-alumina column. **Journal of Chromatography**, v. 603, n. 1+2, p. 290-293, 1992.
- LANGSETH, W., RUNDBERGET, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **Journal of Chromatography**, n. 815, n.1, p. 103-121, 1998.
- LAUREN, D. R., GREENHALGH, R. Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by liquid chromatography. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v. 70, n. 3, p. 479-483, 1987.

- MAROCHI, M. A., SOARES, L. M. V. Metodologia para determinação de tricotecenos e zearalenona em grãos. **Boletim Sociedade da Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 1-8. , 1993.
- MAYCOCK, R., UTLEY, D. Analysis of some trichothecene mycotoxins by liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 347, n.3, p. 429-433, 1985
- OSBORNE, B. G. Mycotoxins and the cereals industry - a review. **Journal of Food Technology**, v. 17, n.1, p. 1-9, 1982.
- ROMER, T. R. Use of small charcoal/alumina clean-up columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v. 69, n. 4, p. 699-703, 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.
- SCOTT, G. E., KING, S. B. Site of action of factors for resistance to *Fusarium moniliforme* in maize. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 9, p. 804-806, 1984.
- 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 Official of Analytical Chemists**, v. 64, n. 6, p. 1364-1371, 1981.
- SCOTT, P. M., KANHERE, S. R., TARTER, E. J. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by electron-capture gas chromatography. **Journal of the Association Official of Analytical Chemists**, v. 69, n. 5, p. 889-893, 1986.

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

TANAKA, T., HASEGAWA, A., MATSUKI, Y., ISHII, K., UENO, Y. Improved methodology for simultaneous detection of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. **Food Additives and Contaminants**, v. 2, n. 2, p. 125-137, 1985.

UENO, Y. **Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects**. Tokyo: Elsevier, v. 4, 1983

UENO, Y. Trichothecenes as Environmental Toxicants. **Reviews in Environmental Toxicology 2**, Amsterdam, p. 303-341, 1986.

## Capítulo 3

---

**Incidência de Desoxinivalenol, Diacetoxiscirpenol e Toxina T2 em Cultivares de Milho Pipoca Plantados no Estado de São Paulo e em Milho Pipoca Comercializado na Cidade de Campinas.**

## Resumo

---

A incidência de tricotecenos em milho pipoca foi avaliada em 90 amostras, pertencentes a 30 cultivares, plantados em Estações Experimentais de Instituto Agrônomo (Campinas, Mococa e Capão Bonito) e em 15 amostras de milho pipoca, sendo 9 de marcas comerciais e 6 à granel, adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Campinas. O método empregado nas análises foi o descrito por FURLONG & SOARES (1995c), combinado com a coluna de limpeza de ROMER (1986). O agente de derivação utilizado foi o anidrido trifluoroacético (TFAA) em piridina e a técnica empregada foi a cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama. As recuperações médias obtidas foram 72% para desoxinivalenol (DON), 88% para diacetoxiscirpenol (DAS) e 87% para toxina T2 (T2). Os limites de detecção encontrados foram 30 ng/g para o DON, 50 ng/g para o DAS e 40 ng/g para a T2. Cinco amostras estavam contaminadas com DON, sendo quatro de procedência comercial e uma procedente de estação experimental. O nível de contaminação nas amostras comerciais variou entre 30 e 40 ng/g. A amostra proveniente da estação experimental estava contaminada com 770 ng/g de DON. Não foram detectados DAS e T2 nas amostras de milho pipoca analisadas neste trabalho. Os dados indicam que os tricotecenos não parecem ser um problema para milho pipoca, mas estes resultados devem ser revistos comparando-os com outras safras de outros anos, uma vez que a contaminação de grãos por micotoxinas obedece uma sazonalidade e portanto podem variar de ano para ano.

---

## INTRODUÇÃO

Os tricotecenos são metabólitos secundários produzidos por várias espécies de *Fusarium*. Mais de 100 tricotecenos já foram identificados, mas menos de 10 destes compostos têm sido encontrados sob condições naturais (UENO, 1983). Os tricotecenos são classificados de acordo com suas estruturas químicas, baseadas num sistema de anel 12,13-epoxitricotec-9-eno e tendo como substituintes vários grupos funcionais. Dentre os tricotecenos mais estudados estão o desoxinivalenol (DON) e o nivalenol (NIV) e entre os mais tóxicos estão a toxina T2 (T2) e o diacetoxiscirpenol (DAS).

Os sintomas característicos dos efeitos tóxicos dos tricotecenos em humanos e animais são vômitos, angina necrótica, diarréia, anorexia, alterações hematológicas, distúrbios neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragias generalizadas, seguidos ou não de morte (SCOTT, 1986; SNYDER, 1986; UENO, 1986).

O DON é o tricoteceno mais freqüentemente encontrado, em níveis acima de 40 mg/kg, em trigo produzido na Alemanha, Nova Zelândia, Estados Unidos, Canadá e Argentina (PLACINTA *et al.*, 1999). Aproximadamente 20% do milho importado da Argentina pela Itália estava contaminado, em níveis não reportados, com toxina T2 e diacetoxiscirpenol. Na opinião de alguns autores, cerca de 100% dos grãos, submetidos à condições climáticas não-favoráveis, estariam contaminados com tricotecenos em níveis entre 30 e 10 000 µg/kg (LANGSETH & RUNDBERGET, 1998).

A incidência mundial de tricotecenos em cereais e seus produtos derivados é alta e bem documentada. Ainda se conhece pouco sobre a incidência de tricotecenos em alimentos nacionais. Um trabalho realizado por SABINO *et al.* (1989) investigou a ocorrência de DON em 120 amostras (70 de trigo e 50 de milho). Apenas 2 amostras de trigo é que foi encontrado DON contendo 0,18µg/g.

FURLONG *et al.* (1995a) e FURLONG *et al.* (1995b) analisaram amostras de trigo provenientes de campos experimentais do Estado de São Paulo e de armazéns da cidade de Rio Grande (RS). Dentre as 20 amostras estudadas, 6 estavam contaminadas. Em ordem decrescente de frequência foram encontradas 4 amostras com DON (470-520 ng/g), 3 amostras com NIV (160-400 ng/g), 2 amostras com toxina T2 (400-800 ng/g) e 1 amostra com diacetoxiscirpenol (600 ng/g).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a incidência de DON, DAS e T2 em amostras de milho pipoca, por tratar-se de um alimento consumido por todas as faixas etárias.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Amostras

Noventa amostras, pertencentes a 30 cultivares experimentais, de milho pipoca recém-colhidos foram coletadas em três Estações Experimentais do Instituto Agrônomo (Campinas, Mococa e Capão Bonito). Na tabela 6 estão relacionados os cultivares que foram avaliados neste trabalho.

Quinze amostras de milho pipoca, sendo 9 marcas e 6 à granel, comercializadas na cidade de Campinas foram adquiridas em mercados e supermercados em pacotes de 500g.

Todas as amostras foram moídas até passarem por uma peneira de 80 mesh, acondicionadas em recipiente de vidro e armazenadas a -18°C.

Tabela 6: Relação dos cultivares de milho pipoca avaliadas nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo em Campinas, Mococa e Capão Bonito, Estado de São Paulo, safra 1998/99.

Número	Sigla	Origem
01	IAC 112	IAC
02	ZÉLIA	Pioneer
03	IAC TC 05	IAC
04	IAC SG 24	IAC
05	IAC SG 46	IAC
06	IAC SG 25	IAC
07	IAC SG 73	IAC
08	IAC SG 21	IAC
09	IAC SG 52	IAC
10	IAC SG 73	IAC
11	IAC SG 119	IAC
12	IAC SG 65	IAC
13	IAC SG 42	IAC
14	IAC SA 10	IAC
15	IAC SA 24	IAC
16	IAC SA 13	IAC
17	IAC SA 30	IAC
18	IAC SA 03	IAC
19	IAC SA 23	IAC
20	IAC SA 18	IAC
21	IAC SA 08	IAC
22	IAC SA 20	IAC
23	IAC SA 01	IAC
24	IAC HT 01	IAC
25	IAC HT 02	IAC
26	IAC TC 01	IAC
27	IAC TC 02	IAC
28	IAC SA 36	IAC
29	IAC SG 12	IAC
30	IAC SG 26	IAC

HSm= híbrido simples modificado; HT= híbrido triplo; TC= top cross; SG= híbrido entre a linhagem da variedade SAM com a variedade Guaran; SA= híbrido entre linhagens da variedade SAM com a variedade IAC-64; HS= híbrido simples.

## **2. Delineamento experimental**

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições, ou seja, no período da colheita, 4 parcelas de cada híbrido foram sorteadas e todo milho em cada parcela foi colhido e reunido. O tamanho da parcela foi de 4 linhas de 5 metros espaçadas de 0,9 metro entrelinhas por 0,2 metro entreplantada. O milho obtido foi seco, debulhado e homogeneizado para a retirada de uma amostra de 500g. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -18°C até o momento da análise.

A solução estoque de padrão interno foi preparada pesando-se 2,5 mg de metil araquidato, dissolvendo em 5 mL de n-hexano (grau cromatográfico) obtendo-se a concentração de 500µg/mL. A solução trabalho foi preparada em concentração 100µg/mL. Esta solução foi acondicionada em frasco âmbar vedado e armazenado a -18°C.

## **3. Padrões de desoxinivalenol (DON), toxina T2 (T2) e diacetoxiscirpenol (DAS) e padrão interno (metil araquidato)**

As soluções estoque individuais de cada tricotecenos – DON, T2 e DAS – (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO) foram preparadas pesando-se 1 mg de cada toxina dissolvendo em 10 mL de benzeno, segundo FURLONG & SOARES (1995c), obtendo-se a concentração de 100µg/mL. As soluções trabalho foram preparadas em concentração 40µg/mL para cada toxina. Estas soluções foram acondicionadas em frascos âmbar vedados e armazenados a -18°C.

#### 4. Determinação de tricotecenos

Para a análise dos tricotecenos (DON, DAS e T2) foi empregado o método de extração de FURLONG & SOARES (1995c) com pequenas modificações. As amostras foram trituradas em moinho até passarem por uma peneira de 80 mesh, armazenadas em recipientes de vidro a -18°C.

Homogeneizar cinquenta gramas de amostra com 270 mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4% por 5 minutos em liquidificador. O extrato inicial foi filtrado, tomou-se uma alíquota de 150 mL e se procedeu clarificação com 150 mL de sulfato de amônio 30%. Novamente, tomou-se uma alíquota de 150 mL e esta foi transferida para um funil de separação contendo 150 mL de água destilada. A partição foi realizada, lentamente, por 3 minutos com 15 mL de diclorometano. Deixou-se em repouso por 10 minutos e se recolheu toda a fase orgânica em um béquer de 50 mL. Procedeu-se novamente a partição e a fase orgânica foi recolhida no mesmo béquer anterior. Agitou-se por 20 segundos em ultra-som para homogeneizar os extratos. Uma alíquota de 15 mL foi seca em banho de água a 50°C e limpa. O volume restante foi seco e guardado (a -18°C) para que se realizasse as reações de confirmação de identidade, caso a amostra estivesse contaminada.

Para realizar a limpeza do extrato seco, foi necessário dissolvê-lo com 5 X 1 mL de acetonitrila:água (84:16) e aplicá-lo na coluna de alumina:carvão (2,3 : 1,9), previamente condicionada com 15 mL de acetonitrila:água (84:16). Eluiu-se a amostra com 40 mL de acetonitrila:água (84:16) a uma vazão de 1 mL/min. O eluato foi concentrado em banho de água a 80°C, até cerca de 2 mL e transferido quantitativamente para frasco de reação de 4 mL e seco.

Ao extrato seco foi adicionado 1 mL de solução de 1,5 mg/mL de piridina em tolueno:acetonitrila (95:5) e 200 µL de TFAA. A derivação foi realizada em banho de água a 60°C por 60 minutos. Deixou-se esfriar a temperatura

ambiente, adicionou-se 1 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5% e agitou-se por 30 segundos em ultra-som. Uma alíquota de 850 $\mu\text{L}$  foi tomada e colocada em um segundo frasco contendo 1 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5% e agitou-se novamente. Tomou-se uma alíquota de 650 $\mu\text{L}$  e esta foi colocada juntamente com 3 $\mu\text{g}$  de padrão interno em um terceiro frasco. Secou-se a 50°C sob leve fluxo de  $\text{N}_2$ . O resíduo foi re-dissolvido com 100 $\mu\text{L}$  de n-hexano (grau cromatográfico) e 1 $\mu\text{L}$  foi analisado por cromatografia gasosa.

Os tricotecenos foram separados e quantificados em cromatógrafo gasoso sob as seguintes condições: temperatura injetor (275°C), temperatura do detector (300°C), programação da coluna (100°C/1min, 6°C/min até 220°C/20 min), vazão do gás de arraste (3,6 mL/min) e fluxo de limpeza do injetor (50 mL/min). O modo de injeção *splitless* e o tempo para início da purga (0,75 min).

## 5. Controle de qualidade analítico

As amostras foram analisadas em 12 séries de 8 e uma série de 9, sendo que cada série incluiu um teste de recuperação onde uma amostra controle, não contaminada naturalmente, foi fortificada com 0,5 $\mu\text{g/g}$  de DON, DAS e T2. Os teores de tricotecenos, encontrados nas amostras, foram corrigidos de acordo com a recuperação encontrada na amostra controle contaminada artificialmente pertencente a cada série. Duplicatas de uma mesma amostra, caso contaminada naturalmente, foram analisadas em dias diferentes seguindo o item 4.

A recuperação e a repetibilidade foram testadas em amostras artificialmente contaminadas com 0,5 $\mu\text{g/g}$  de cada tricoteceno (DON, T2 e DAS). Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados de acordo com as recomendações da "AMERICAN CHEMICAL SOCIETY" (1980). Uma amostra, não-contaminada naturalmente, foi fortificada com padrão dos tricotecenos, derivada e injetada 5 vezes no cromatógrafo à gás. O desvio padrão

( $\sigma$ ) destas 5 injeções foi então calculado. O limite de detecção de cada tricoteceno foi determinado como sendo a menor quantidade que gerasse um sinal três vezes maior que o ruído ( $\sigma$ ). O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração que produzisse um sinal cinco vezes maior que o limite de detecção. Curvas de calibração interna foram construídas para cada um dos tricotecenos estudados neste trabalho.

## **6. Confirmação de identidade**

Para a confirmação da identidade dos tricotecenos, encontrados nas amostras, foram empregadas as reações de acetilação segundo o método de FURLONG & SOARES (1995c) e a reação de derivação deste mesmo método, mas empregando como reagente de derivação o pentafluoropropionilimidazol (PFPI).

**6.1. Reação de acetilação:** evaporar uma alíquota contendo tricoteceno. Deixar o resíduo, durante duas horas a 60°C, em meio contendo 200 $\mu$ L de uma mistura de piridina: anidrido acético na proporção de 1:1. Após resfriamento, evaporar a mistura a temperatura ambiente sob fluxo de nitrogênio. Ressuspender em 1000 $\mu$ L de tolueno:acetonitrila (95:5) e lavar duas vezes com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5%. Tomar uma alíquota, juntar ao padrão interno, secar, ressuspender em n-hexano e proceder a análise cromatográfica.

**6.2. Reação de derivação com PFPI:** evaporar uma alíquota contendo tricotecenos. Efetuar a derivação adicionando 500 $\mu$ L de tolueno:acetonitrila (95:5) e 35 $\mu$ L de PFPI. Deixar em banho-maria a 60°C por 60 minutos. Esfriar, adicionar mais 500 $\mu$ L de tolueno:acetonitrila (95:5) e lavar a fase orgânica duas vezes com 1000 $\mu$ L de tampão fosfato 0,1M pH 7,0. Deixar em congelador para separação das fases. Transferir uma alíquota para um frasco contendo padrão interno, secar, ressuspender em n-hexano e proceder a análise cromatográfica.

**7. Descontaminação do material:** todo material utilizado nas análises foi descontaminado com solução comercial de hipoclorito de sódio por 24 horas. Após o período de descontaminação, o material foi lavado normalmente, enxaguado com água destilada e seco em temperatura ambiente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTR  
SEÇÃO CIRCULAN

### 1. Controle de qualidade analítico.

As curvas padrão para DON, DAS e T2 foram lineares de 10 a 65 ng/ $\mu$ L, de 10 a 65 ng/ $\mu$ L e de 10 a 85 ng/ $\mu$ L respectivamente. Os limites de detecção foram 30 ng/g para DON, 50 ng/g para DAS e 40 ng/g para T2. Os valores médio de recuperação, 18 repetições, foram 72 % para DON, 88% para DAS e 87 % para T2

A repetibilidade do método mostrou-se adequada com desvios padrão relativos (RSD) de 9,8 % para DON, 6,3 % para DAS e 6,6 % para a T2. As amostras foram analisadas em duplicata. O desvio padrão relativo (RSD) entre duplicatas foi de 9,7% . A quantificação foi executada comparando-se as áreas relativas dos picos com as áreas relativas dos padrões.

### 2. Incidência de tricotecenos.

Cinco amostras, das cento e cinco analisadas, estavam contaminadas apenas com DON. Quatro amostras, de milho pipoca de procedência comercial, estavam contaminadas com DON em níveis entre 32 e 40 ng/g. A identificação da identidade da toxina nestas amostras não foi possível em virtude dos baixos níveis de contaminação encontrados. Uma amostra proveniente

da estação experimental estava contaminada com 770 ng/g de DON e nesta foi possível realizar a confirmação da identidade da toxina. O cromatograma desta última amostra está na Figura 27.

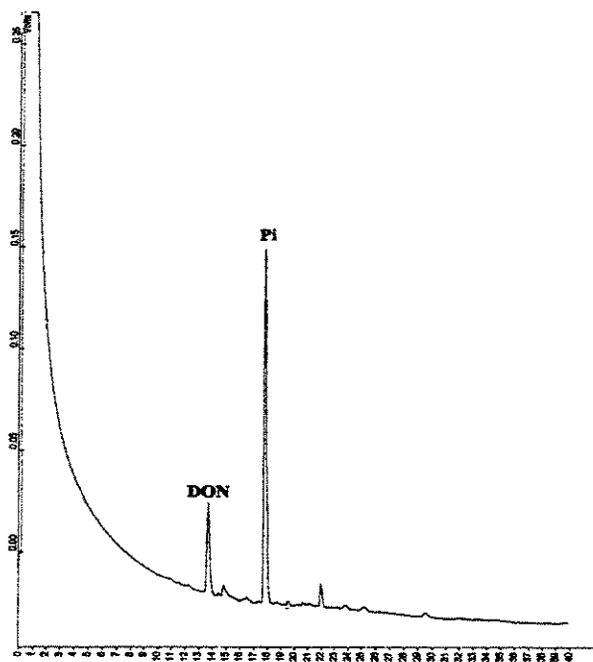
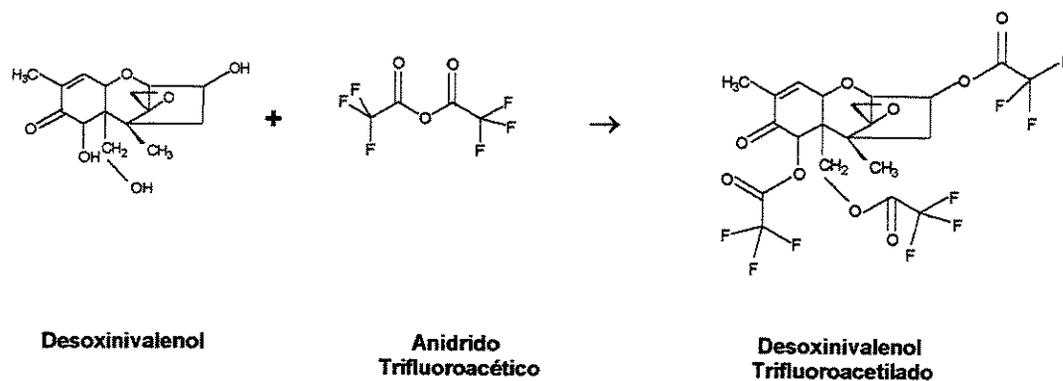


Figura 27: Amostra de milho pipoca naturalmente contaminada com DON.

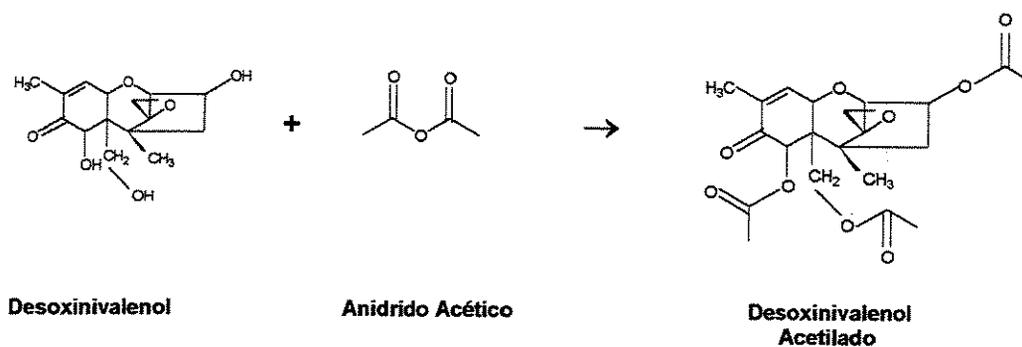
### 3. Confirmação de identidade.

A confirmação de identidade foi realizada comparando-se o comportamento do padrão e da amostra, presuntiva de contaminação, após serem submetidos às reações descritas nos itens 6.1 e 6.2. As estruturas químicas dos derivados formados nestas reações estão na Figura 28.

a)



b)



c)

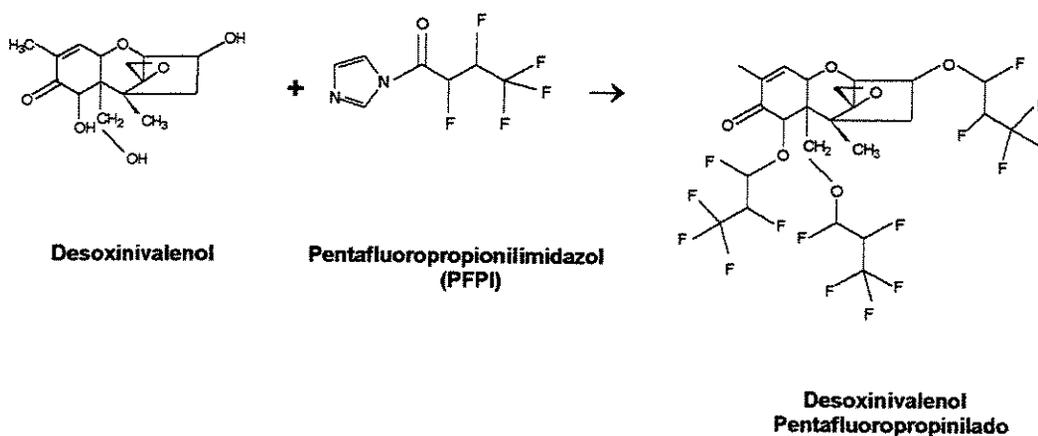


Figura 28: Derivados do desoxivalenol após reação de derivação com: (a) anidrido trifluoroacético; (b) anidrido acético; (c) pentafluoropropionilimidazol (PFPI).

Nas Figuras 29 e 30, estão os cromatogramas do padrão de DON e da amostra acetilados, e na Figura 31 está o cromatograma do enriquecimento da amostra acetilada (DON<sub>acetilado</sub> + amostra<sub>acetilada</sub>). A tabela 7 traz a área realtiva (área<sub>DON</sub>/área<sub>Pi</sub>) e os tempos de retenção relativos (tempo de retenção<sub>DON</sub>/tempo de retenção<sub>Pi</sub>) da solução padrão, da amostra e da amostra enriquecida acetiladas. As Figuras 32 e 33 são cromatogramas do padrão DON e da amostra derivados com PFPI. Na Figura 34 está o cromatograma da amostra enriquecida com DON e derivada com PFPI (DON<sub>PFPI</sub> + amostra<sub>PFPI</sub>). A tabela 8 traz a área realtiva (área<sub>DON</sub>/área<sub>Pi</sub>) e os tempos de retenção relativos (tempo de retenção<sub>DON</sub>/tempo de retenção<sub>Pi</sub>) da solução padrão, da amostra e da amostra enriquecida derivadas com PFPI. Como mostram estas quatro Figuras (29, 30, 32 e 33) e as duas Tabelas (7 e 8), tanto a amostra como o padrão apresentaram os mesmo comportamento quando acetilados e quando derivados com PFPI. O enriquecimento da amostra (Figuras 31 e 34) foi empregado como um artifício adicional na confirmação da identidade da toxina presente na amostra. Como o esperado, o pico do DON (acetilado ou derivado com PFPI) teve aumento na área. Estes resultados possibilitam afirmar, a amostra contém DON.

Tabela 7: Área relativa e tempo de retenção relativo após a reação de acetilação.

	Área relativa		Tempo de retenção relativo	
	1º. Pico	2º. Pico	1º. Pico	2º. Pico
Solução padrão de DON	0,32	0,85	1,24	1,48
Amostra	0,31	0,04	1,24	1,48
Amostra + solução padrão de DON	0,35	0,23	1,24	1,48

Tabela 8: Área relativa e tempo retenção relativo após derivação com PFPI

	Área relativa		Tempo de retenção relativo	
	1º. Pico	2º. Pico	1º. Pico	2º. Pico
Solução padrão de DON	0,08		0,90	
Amostra	0,01		0,90	
Amostra + solução padrão de DON	0,04		0,89	

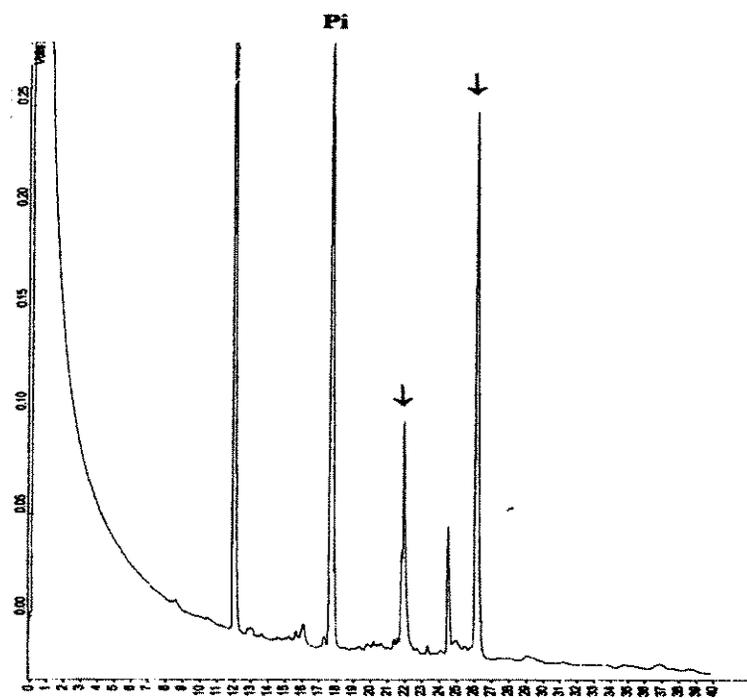


Figura 29: Perfil cromatográfico do padrão de DON acetilado

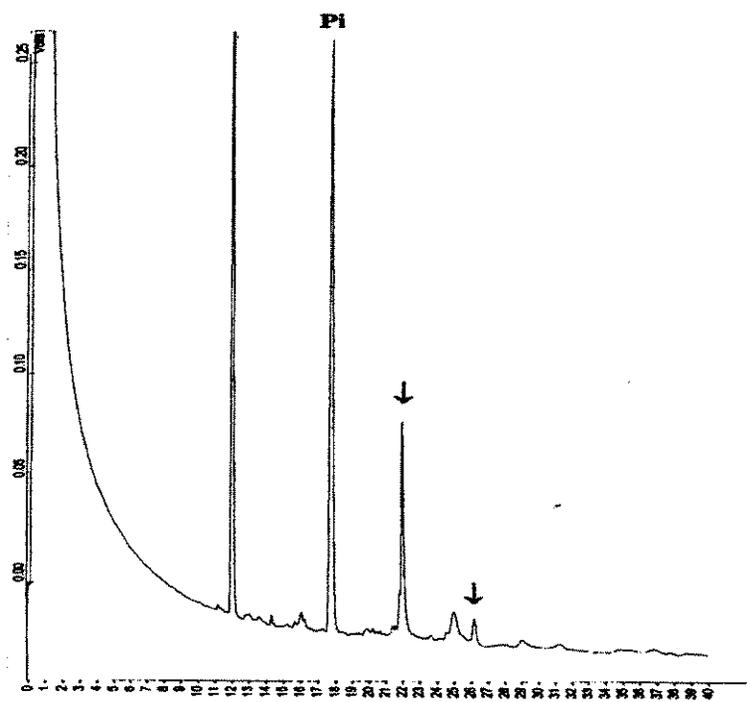


Figura 30: Perfil cromatográfico da amostra acetilada.

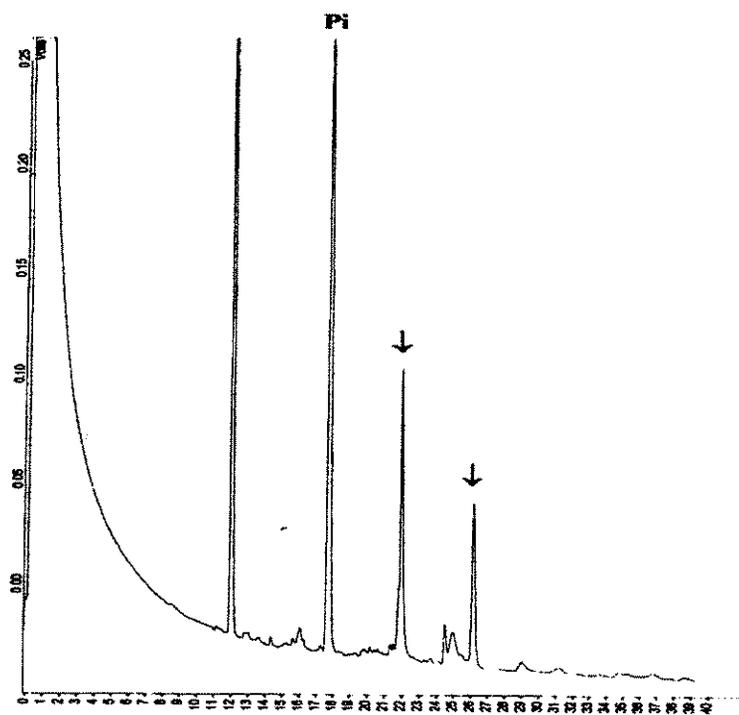


Figura 31: Perfil cromatográfico da amostra enriquecida com DON e acetilada (DON<sub>acetilado</sub> + amostra<sub>acetilada</sub>)

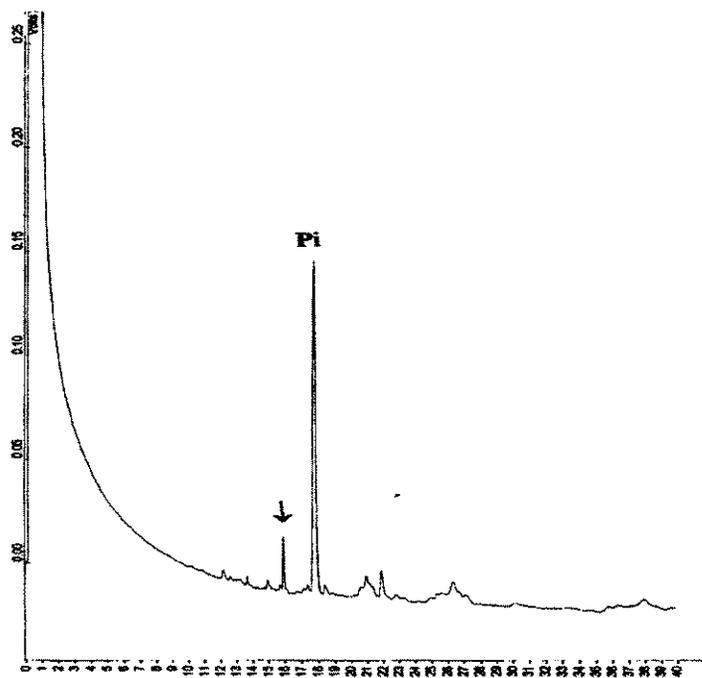


Figura 32: Perfil cromatográfico do padrão de DON derivado com PFPI.

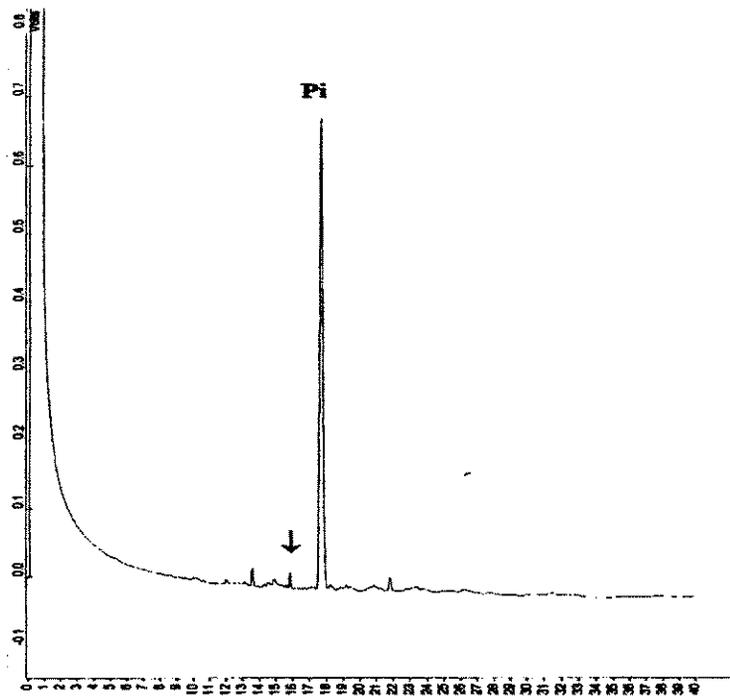


Figura 33: Perfil cromatográfico da amostra derivada com PFPI.

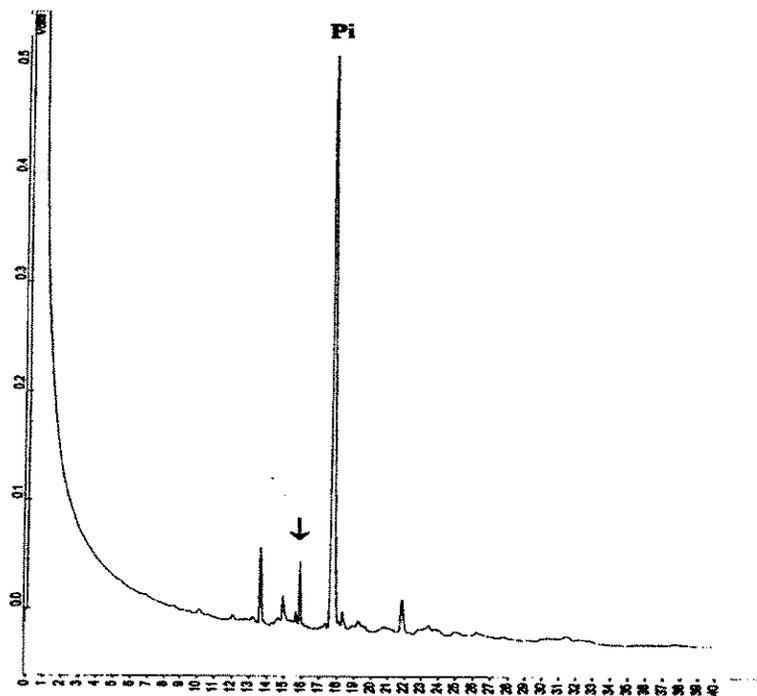


Figura 34: Perfil cromatográfico da amostra enriquecida com DON e derivada com PFPI (DON<sub>PFPI</sub> + amostra<sub>PFPI</sub>)

## CONCLUSÕES

Das cento e cinco amostras analisadas no presente trabalho, cinco estavam contaminadas com DON, sendo quatro de procedência comercial e uma procedente de estação experimental. O nível de contaminação nas amostras comerciais variou entre 30 e 40 ng/g. A amostra proveniente da estação experimental estava contaminada com 770 ng/g de DON. Não foram detectados DAS e T2 nas amostras de milho pipoca analisadas neste trabalho.

O nível de contaminação encontrado da amostra proveniente de estação experimental, 770 ng/g, está abaixo do limite máximo, 1 µg/g, recomendado pelo "Food and Drug Administration" dos Estado Unidos para farelo,

farinha e germe para consumo humano. No Brasil não há regulamentação para nível de DON em alimentos e rações.

Os dados obtido indicam que a incidência de tricotecenos em milho pipoca plantado no Estado de São Paulo é baixa. O resultado do levantamento, realizado nas amostras comerciais, indica que não há risco para a população no consumo de milho pipoca com relação a estes tricotecenos devido a baixa incidência e teores encontrados.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. **Analytical Chemistry**, 52, n. 14, p. 2242-2249, 1980.

FURLONG, E.B.; SOARES, L. M. V.; LASCA, C. C.; KOHARA, E. Y. Mycotoxins and fungi in wheat harvestes during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathology**, v. 131, p. 185-190, 1995 a.

FURLONG, E. B.; SOARES, L .M. V.; LASCA, C. C.; KOHARA, E. Y. 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, 1995 b.

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

LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 815, , n. 1, p. 103-121, 1998.

PLACINTA, C. M.; D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M .C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, n. 1, p. 21-37, 1999.

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

SABINO, M.; ICHIKAWA, A. H.; INOMATA, E. I.; LAMARDO, L. C. A. Determinação de desoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 49, p. 155-159, 1989.

SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R. Comparison of column phases for separation of derivatized trichothecenes by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 368, n. 2, p. 374-380, 1986.

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

UENO, Y. Trichothecenes as Environmental Toxicants. **Reviews in Environmental Toxicology 2**, Amsterdam, p. 303-341, 1986.

## CONCLUSÕES

Vários sistemas de extração e limpeza foram testados e o método de extração e limpeza descrito por FURLONG & SOARES (1995c), combinado com coluna de limpeza de ROMER (1986), foi considerado o mais adequado para proceder à determinação de tricotecenos em milho para pipoca. As recuperações médias obtidas foram 72% para o DON, 88% para o DAS e 87% para a T2. Os coeficientes de variação médios para amostras artificialmente contaminadas, no nível de 500 ng/g, foram 9,8, 6,3, e 6,6% para DON, DAS e T2, respectivamente.

Noventa amostras de milho pipoca plantado em estações experimentais do Estado de São Paulo foram analisadas para os tricotecenos desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol e toxina T2. As amostras correspondiam a 30 cultivares que foram plantados em três regiões do Estado, Campinas, Mococa e Capão Bonito. Apenas uma amostra foi encontrada contaminada a um nível de 770 ng/g de DON. Esta concentração está abaixo do limite máximo, 1µg/g, recomendado pelo "Food and Drug Administration" dos Estados Unidos para farelo, farinha e germe para consumo humano. Amostras de pipoca oferecidas ao consumo em estabelecimentos comerciais foram adquiridas na cidade de Campinas e dentre 15 amostras analisadas, 4 continham DON entre 30 e 40 ng/g. Os tricotecenos DAS e T2 não foram detectados em nenhuma das amostras.

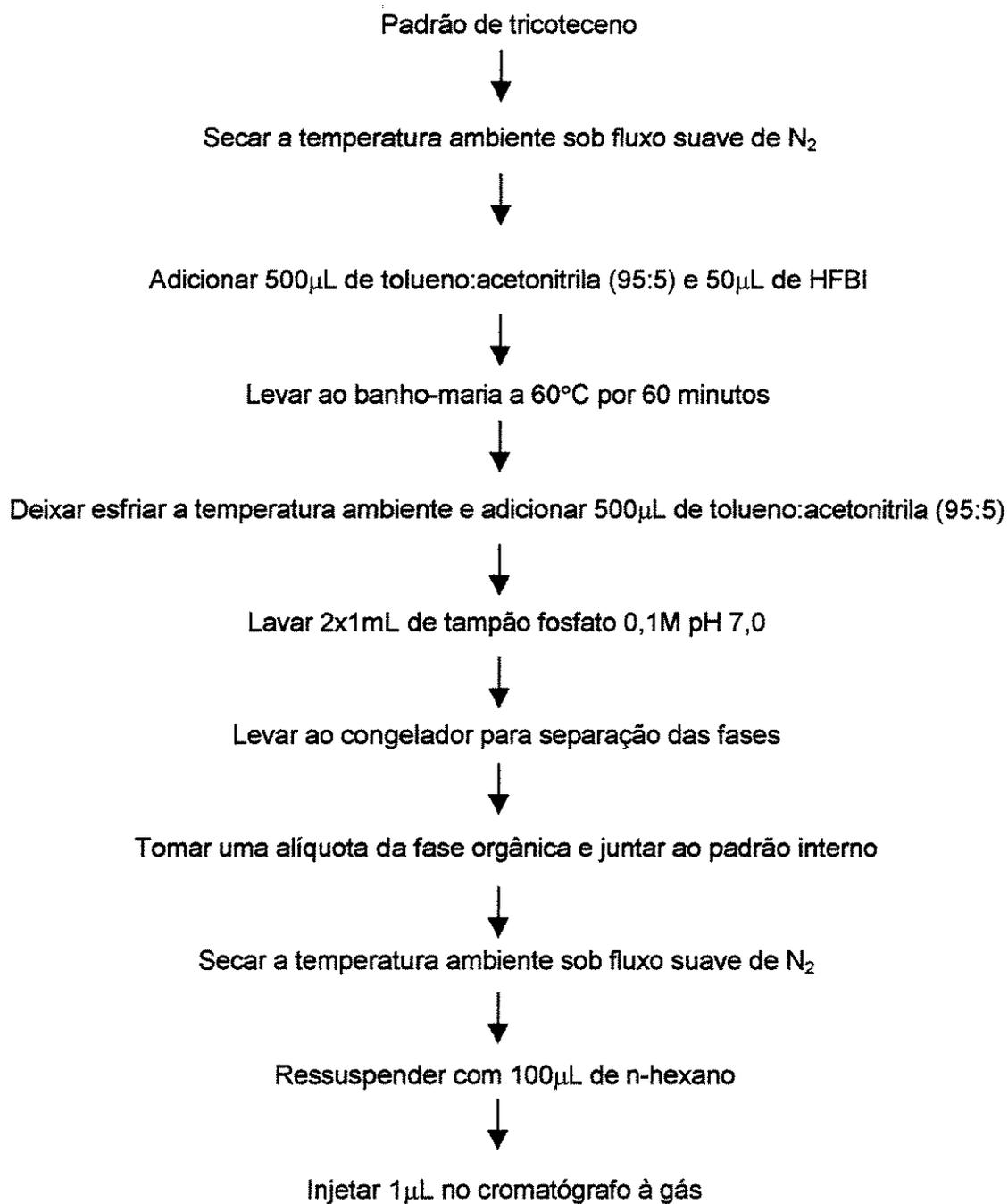
Os dados obtidos indicam que a incidência de tricotecenos em milho pipoca plantado no Estado de São Paulo é baixa. O resultado do levantamento, realizado nas amostras comerciais, indica que não há risco para a população no consumo de milho pipoca com relação a estes tricotecenos devido a baixa incidência e teores encontrados. Como a contaminação de grãos por micotoxinas obedece uma sazonalidade e portanto pode variar de ano para ano, os resultados do presente trabalho devem ser revistos comparando-os com outras safras em outros anos.

## **Anexos**

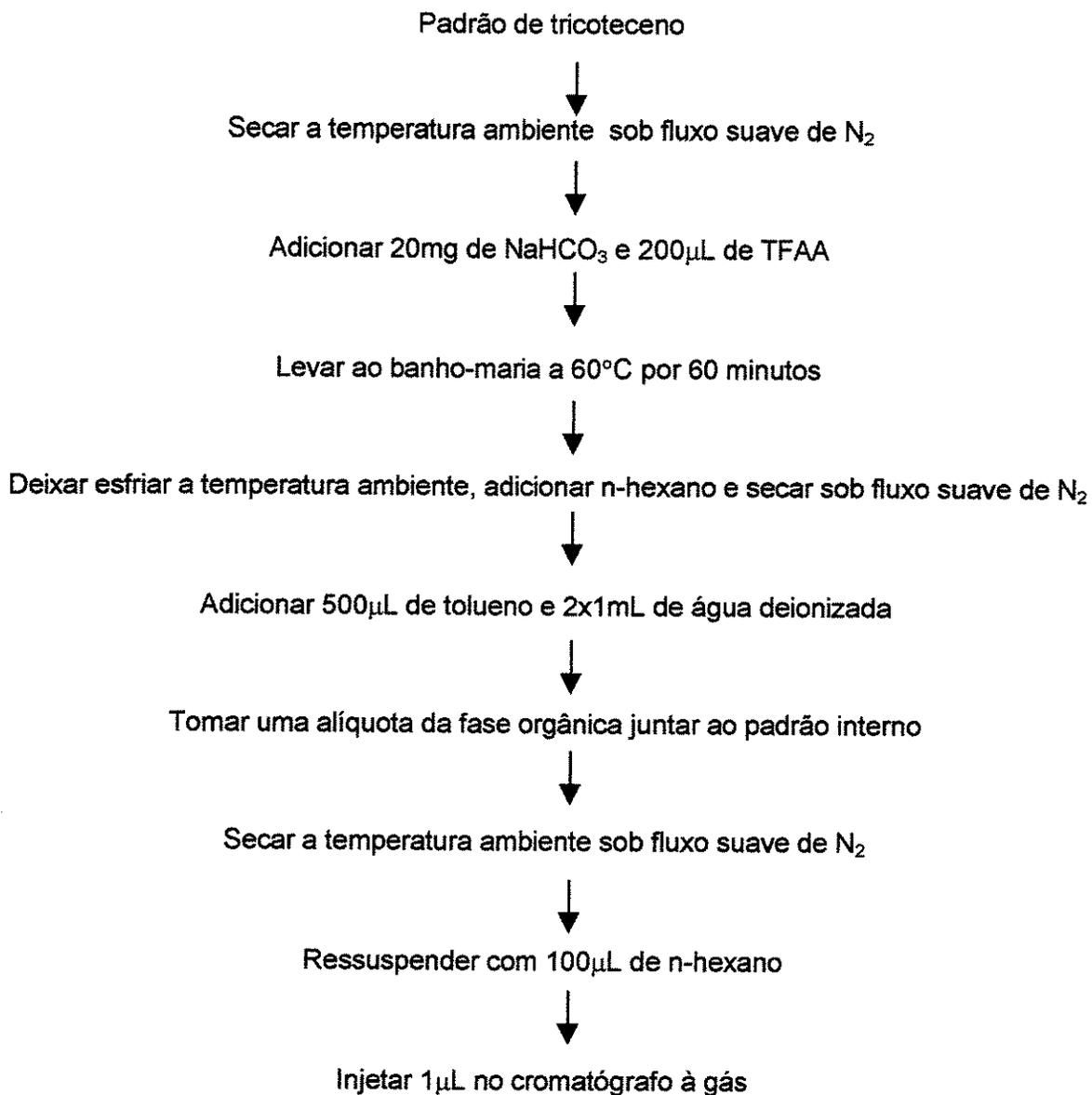
---

## Fluxogramas dos métodos descritos no Capítulo 2

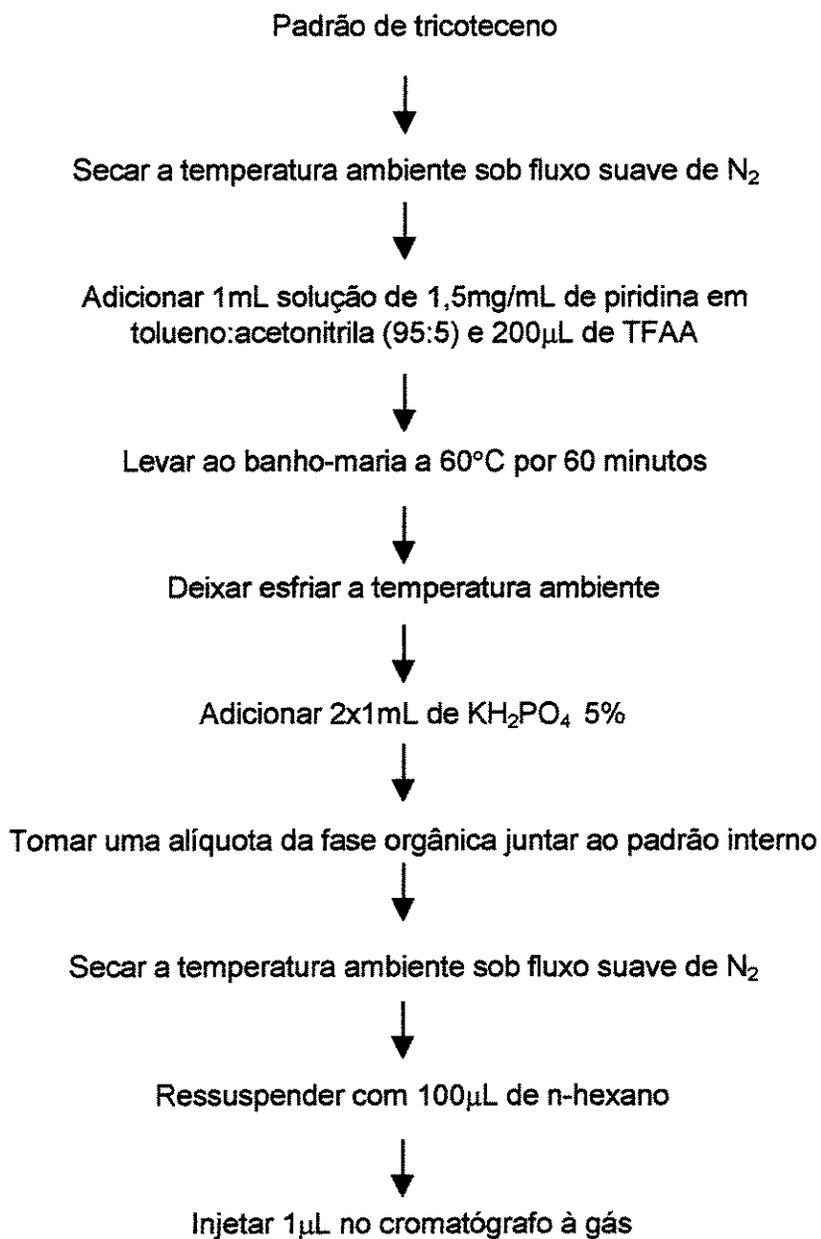
### 1- Reação de derivação com HFBI



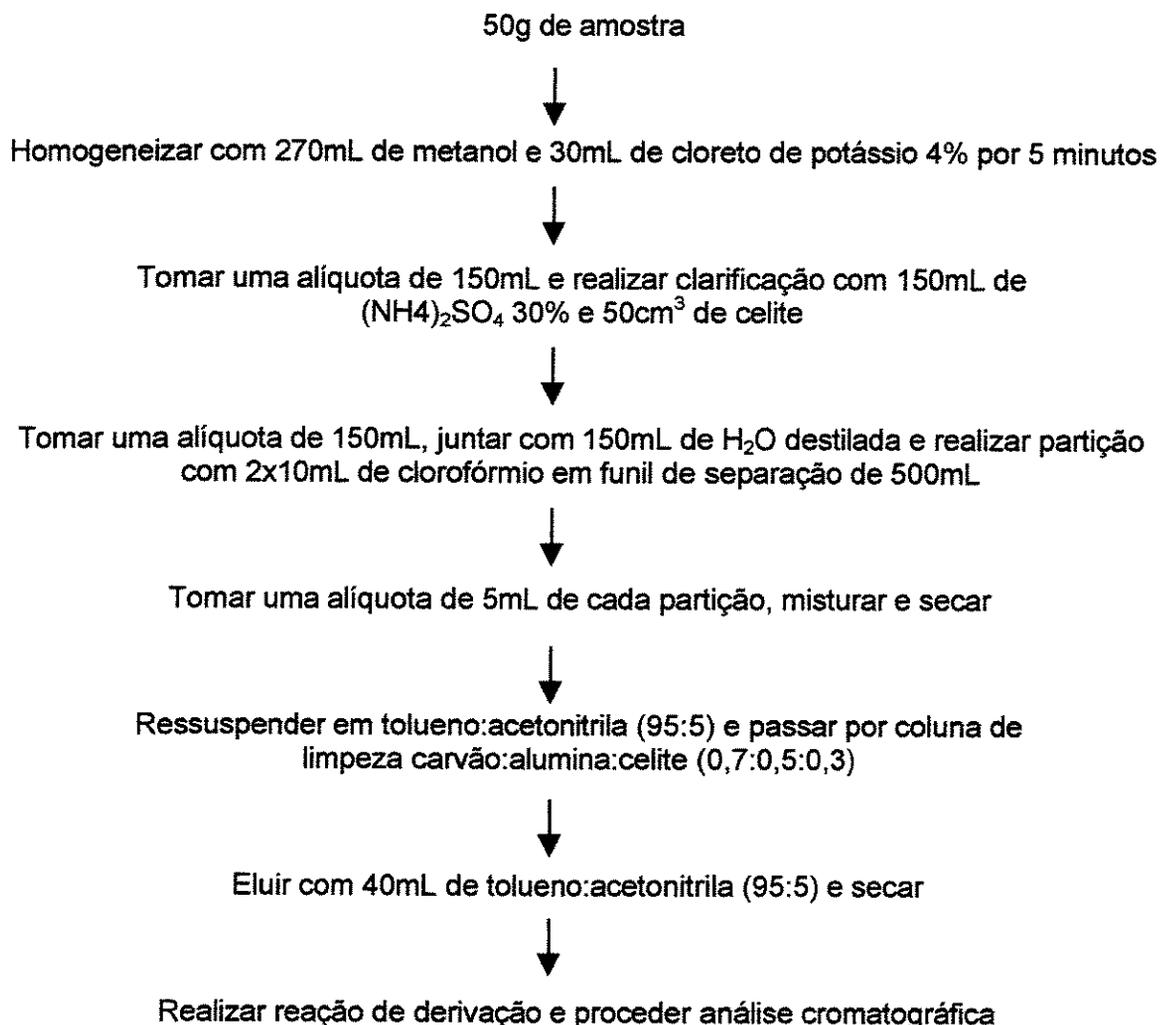
## 2- Reação de derivação com TFAA/NaHCO<sub>3</sub>



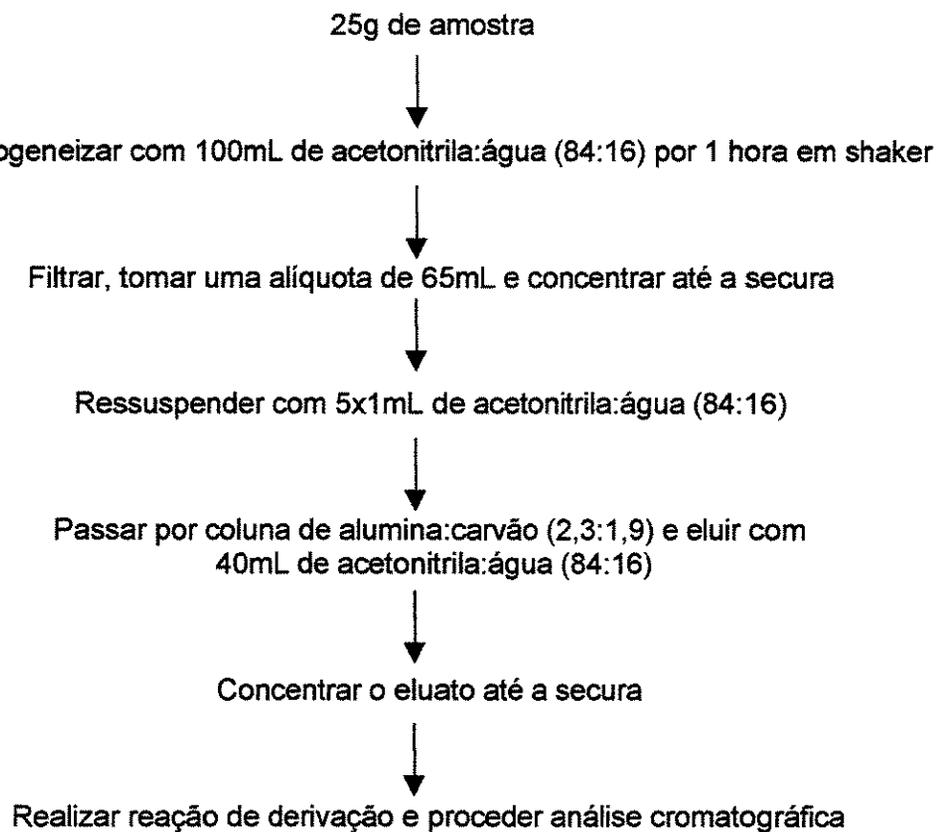
### 3- Reação de derivação com TFAA/piridina



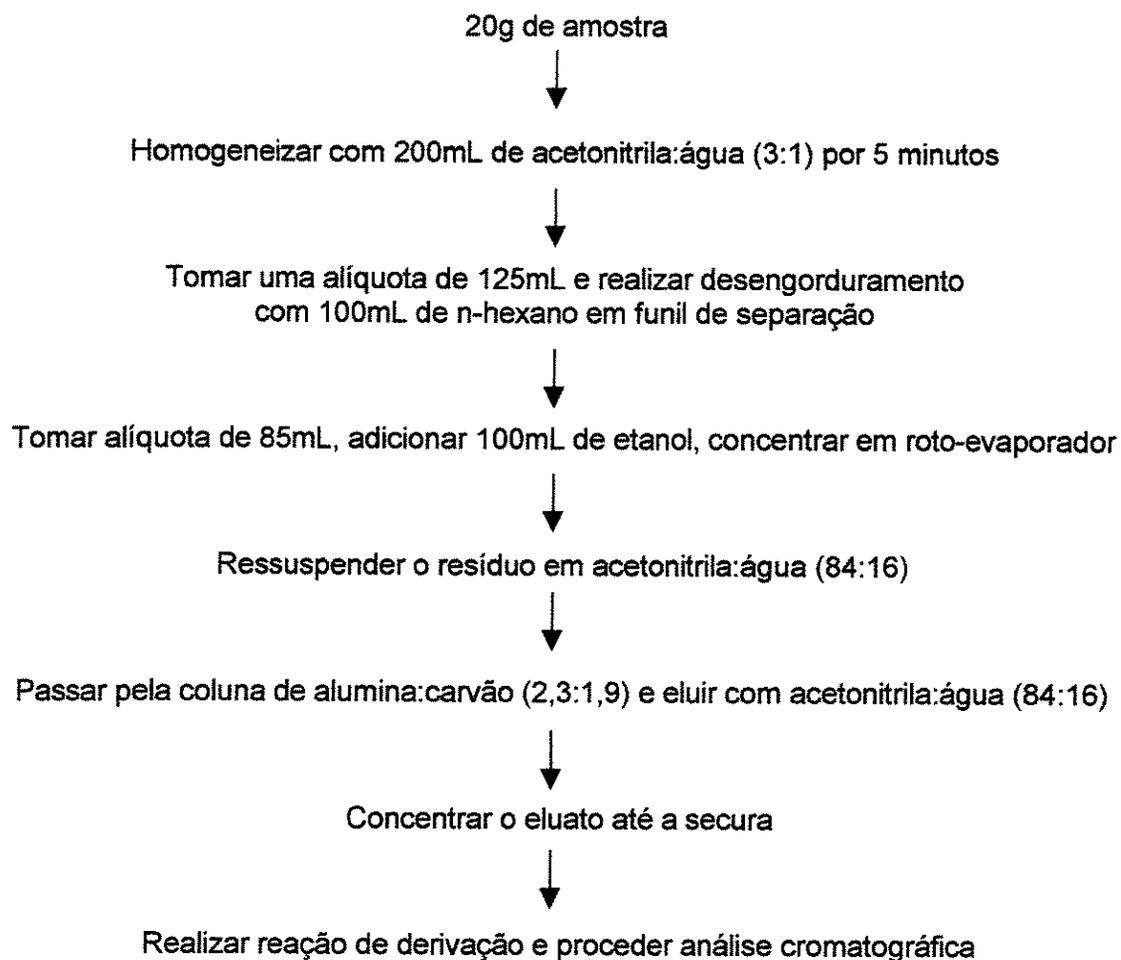
#### 4- Método descrito por FURLONG & SOARES (1995)



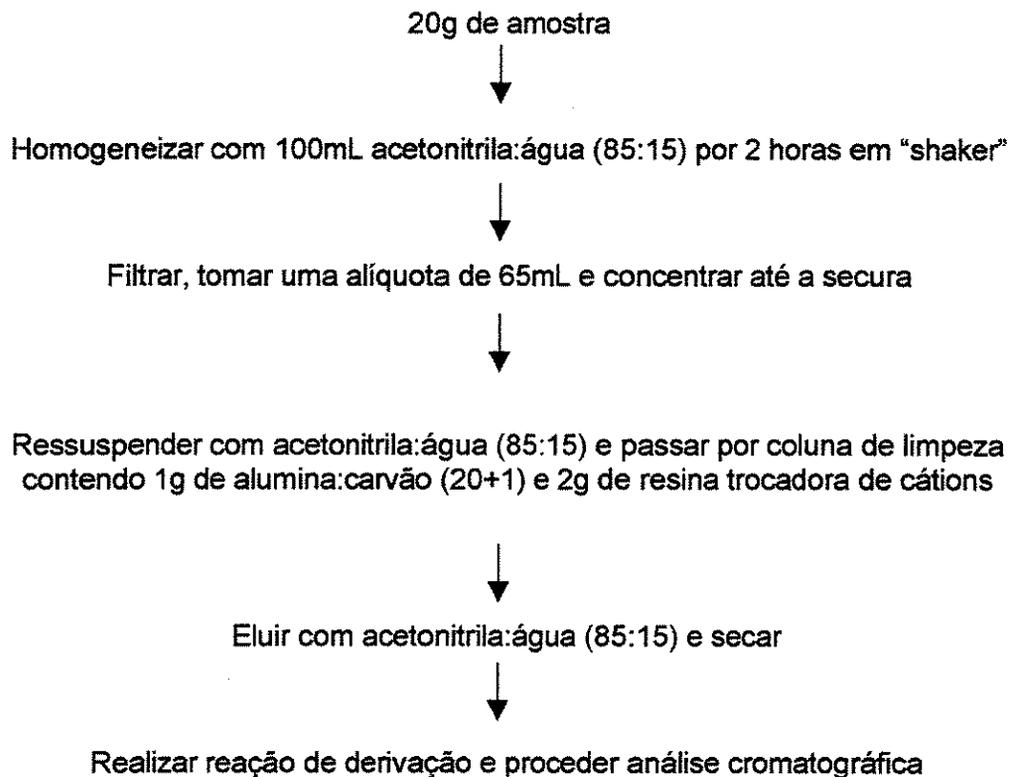
**5- Método descrito por LANGSETH & CLASEN (1992) combinado com coluna de limpeza alumina:carvão (ROMER, 1986)**



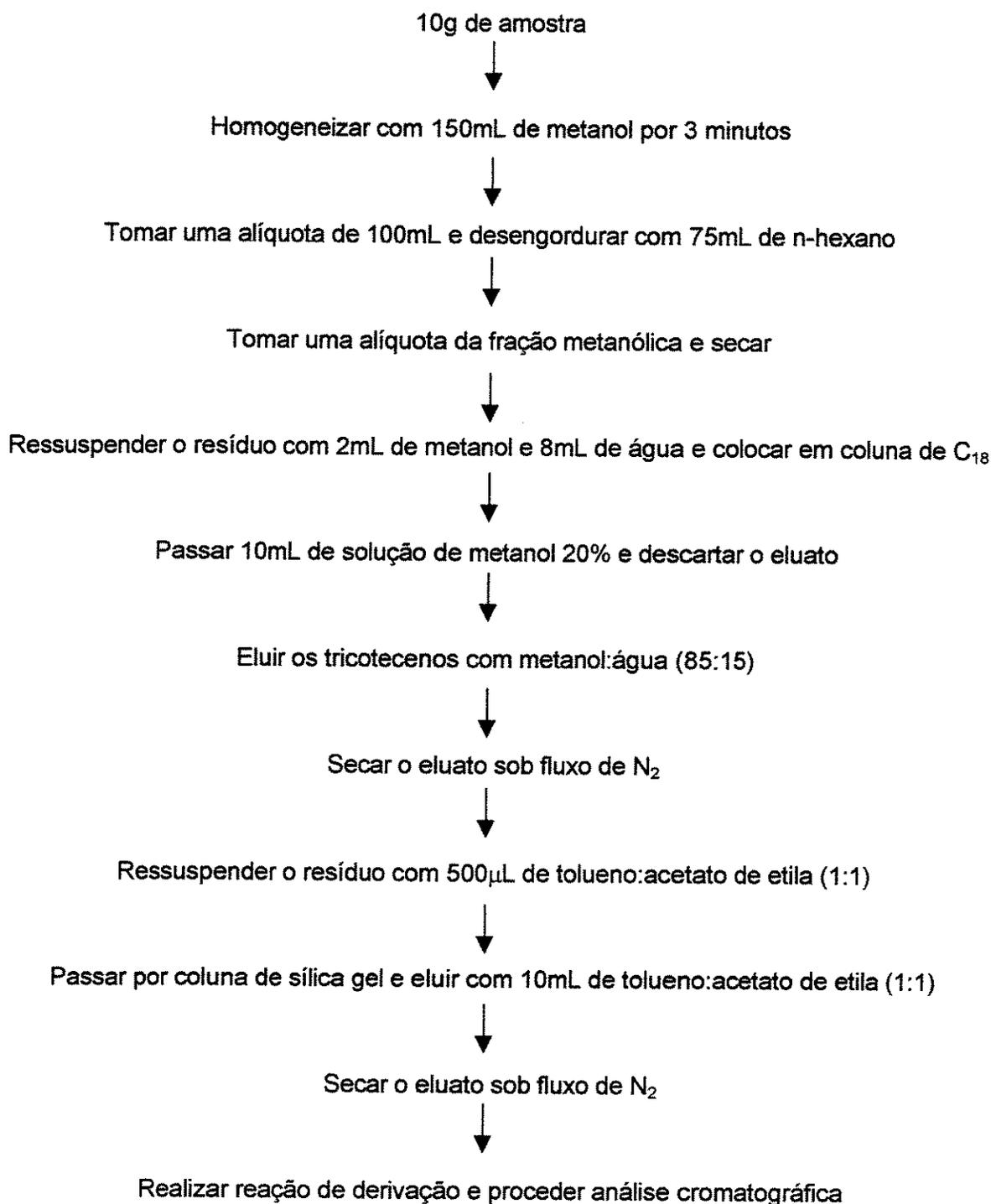
**6- Método descrito por TANAKA (1985) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (ROMER, 1986)**



## 7- Método de extração e limpeza descrito por LAUREN & GREENHALGH (1987)

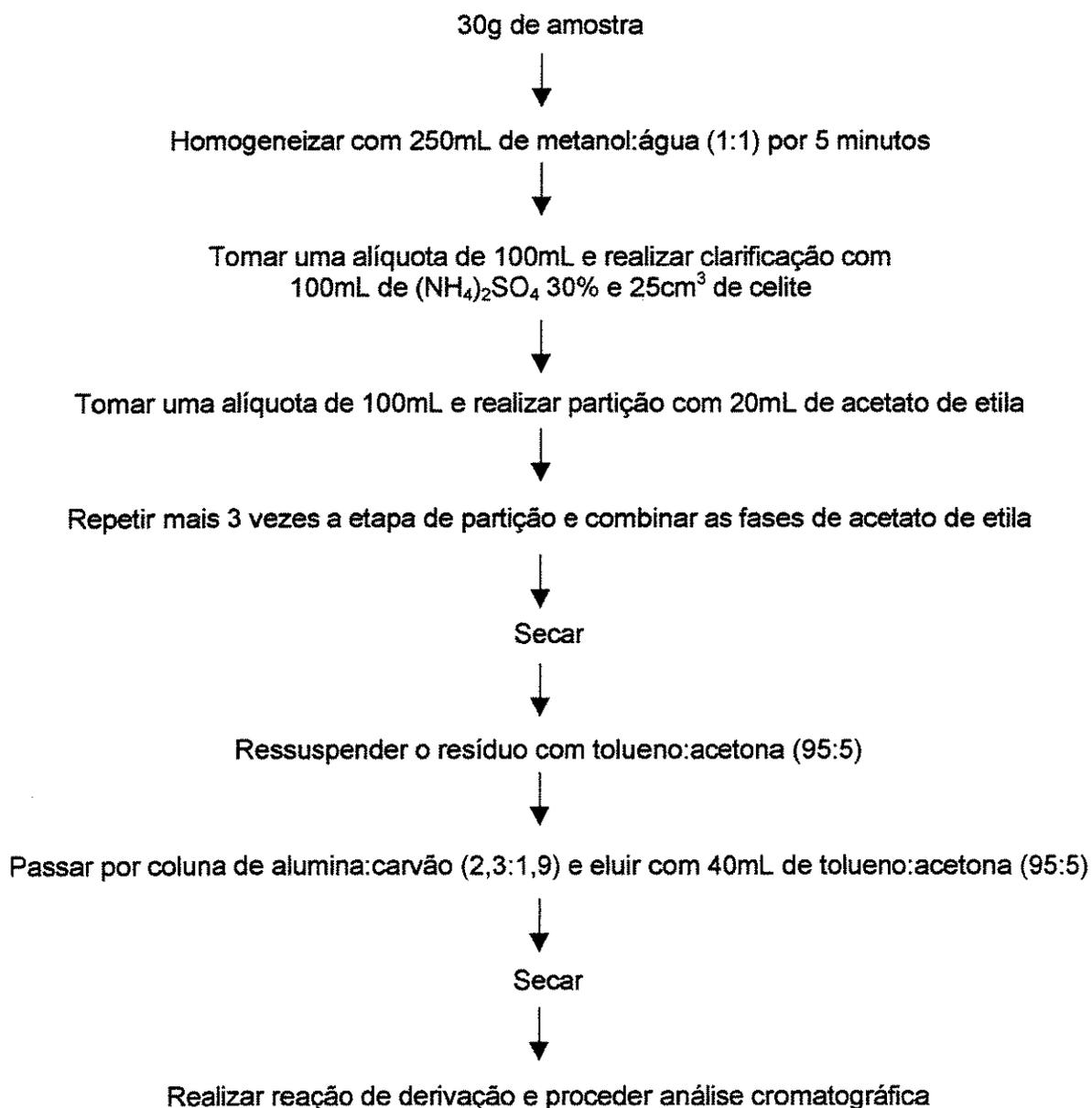


## 8- Método de extração e limpeza descrito por ROSEN & ROSEN (1984)



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**9- Sistema de extração descrito por SCOTT *et al.* (1981) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (ROMER, 1986)**



**10- Sistema de extração descrito por SCOTT *et al.* (1986) combinado com limpeza em coluna de alumina:carvão (ROMER, 1986)**

