



Determinação simultânea de micotoxinas em milho e ração para frangos pelo método multianalito por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem.

Maria de Lourdes Mendes de Souza

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Química de Produtos Naturais,

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sônia Soares Costa

Rio de Janeiro

Agosto de 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais
Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais

Determinação simultânea de micotoxinas em milho e ração para frangos pelo método multianalítico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem.

Maria de Lourdes Mendes de Souza

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sônia Soares Costa
Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Dr^a. MYRNA SABINO
Instituto Adolfo Lutz -SP

Dr^a. MARIA ANTÔNIA CALORI DOMINGUES
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

Dr^a. IZABELA MIRANDA DE CASTRO
EMBRAPA Agroindústria de Alimentos

Dr. RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA GODOY
EMBRAPA Agroindústria de Alimentos

Prof^a. Dr^a. LUZINEIDE W. TINOCO
Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. NANCY BARBI
Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. VERA LÚCIA PATROCÍNIO PEREIRA
Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro

2009

Souza, Maria de Lourdes Mendes de

Determinação simultânea de micotoxinas em milho e ração para frangos pelo método multianalito por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem./

Maria de Lourdes Mendes de Souza. - Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, 2009

xv, 116f.:il.31cm.

Orientador: Sônia Soares Costa

Tese (doutorado) – UFRJ/ Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais/ Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais, 2009.

Referências Bibliográficas: f. 101-116

1. Micotoxinas 2. cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem 3. análise multianalito 4. milho 5. ração para frango I. Costa, Sônia Soares II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais III. Título.

Dedicatória

Dedico esta tese a todas as pessoas que sempre me apoiaram incondicionalmente: minha família, meu pai Germano José de Souza, minha mãe Filomena Mendes de Souza. meus irmãos, Kátia, Germano, Maria das Graças, Maria da Glória, Gecilda e Eunice Mendes de Souza e principalmente a minha orientadora nas ciências Sônia Soares Costa.

Agradecimentos

Quero agradecer ao Deus supremo que me possibilitou experienciar a vida.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Sônia Soares Costa, que aceitou o desafio de me orientar pela segunda vez, sendo desta vez um assunto diferente de sua área específica de trabalho. Que acreditou em mim quando até eu duvidava. Além de ser um exemplo de dedicação, compromisso e ética profissional, sempre demonstrou que o mais importante é o que trazemos no coração.

Aos membros da banca: Dra. Myrna Sabino por ser um exemplo de dedicação no estudo de micotoxinas tornando-se uma referência na área; Dra. Maria Antônia Calori Domingues, pela amizade, apoio e por tirar muitas dúvidas minhas durante a tese, pelo auxílio e contribuições para a melhoria deste trabalho; Dra. Izabela Miranda de Castro, pela amizade, companheirismo no trabalho e auxílio na redação final da tese; Dr. Ronel Luiz de Oliveira Godoy pela amizade, companheirismo no trabalho e ser meu conselheiro acadêmico, a Dra. Luzineide W. Tinoco pelo apoio e a todos por terem aceitado avaliar meu trabalho.

Aos meus orientadores na Áustria: Michael Sulyok, Rainer Schuhmacher que me orientaram e receberam muito bem na Áustria e em especial ao Dr. Rudolf Krska, pela possibilidade de realizar este trabalho no laboratório Center for Analytical Chemistry Department for Agrobiotechnology, IFA-Tulln, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna

A Regina Lúcia dos Santos Sandes por ter cuidado muito bem da minha casa e meus filhotes Tuca e Maya nas minhas muitas ausências, deixando-me tranquila para trabalhar.

Aos meus amigos da Embrapa Agroindústria de Alimentos, em especial: Otniel Freitas-Silva, Antônio Xavier de Farias, Regina Nogueira, Amauri Rosental, Elizabeth Gonçalves, pelo apoio e incentivo antes e durante a tese.

A Sônia Ubatuba que acompanha minha caminhada desde meu mestrado.

Aos meus amigos do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais Douglas, Maria Fernanda pelo apoio, companheirismo e entusiasmo necessários na caminhada.

Às amigas Zaneta Krubs e Larissa Cardilo Reis que me acompanharam durante minha estadia em Viena, obrigada pela amizade, pelo apoio e pela convivência tão harmoniosa e agradável.

A todos meus amigos que eu não citei aqui por serem muitos, mas são muito importantes para mim pelo apoio e incentivo na minha caminhada, que repartem parte do seu tempo comigo trocando experiências de vida, alegrias e preocupações, cada um de uma maneira singular, saibam que estão em meu coração.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trabalho, seja através de conselhos, conversas e àquelas que torcem por mim!!

A Embrapa pelo apoio financeiro e suporte técnico possibilitando dedicação integral ao doutorado.

A University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna Department for Agrobiotechnology, IFA-Tulln pelo apoio e suporte técnico.

A Romers Lab. Tulln pelos padrões cedidos.

"A primeira tarefa na educação é ensinar a ver.
Os olhos tem que ser educados para que nossa alegria aumente."

Rubem Alves

"De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes
de terminar..."

Façamos da interrupção um caminho novo.
Da queda, um passo de dança.
Do medo, uma escada.
Do sonho, uma ponte.
Da procura... um encontro."

Fernando Sabino (in: Encontro
Marcado)

"Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz de ser feliz."

Almir Sater e Renato Teixeira (Tocando em Frente)

RESUMO

Determinação simultânea de micotoxinas em milho e ração para frangos pelo método multianalito por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tandem.

Maria de Lourdes Mendes de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Soares Costa

Resumo da tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Química de Produtos Naturais.

O Brasil é o terceiro maior exportador mundial de milho e primeiro em exportação de frango, sendo a maior parte do milho produzido destinado à composição de diferentes tipos de ração. O milho é um produto suscetível a vários tipos de contaminação fúngica. A Comunidade Européia vem estabelecendo limites cada vez menores para contaminação por micotoxinas. O objetivo deste trabalho é avaliar quantitativamente as micotoxinas que podem estar presentes em amostras de milho e ração para frango produzidas no Brasil. Utilizou-se o método multimicotoxinas baseado em CLAE-EM/EM para investigar a ocorrência de metabólitos fúngicos em 119 amostras coletadas em uma fábrica de ração para frangos: milho em grão (74), produto de descarte (9) e amostras de ração (36). Das 101 micotoxinas avaliadas, vinte foram detectadas e quantificadas: aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, fumonisinas B₁, B₂ e B₃, fumonisina B₁ hidrolisada, zearalenona, agroclavina, canoclavina, desoxinivalenol, nivalenol, eniatina A, A₁, B, B₁, bovericina, ácido cójico e moniliformina. A maioria das amostras estava contaminada com mais de uma micotoxina. A recuperação ficou entre 70 e 120% para 73 micotoxinas em milho, enquanto para ração 65 micotoxinas apresentaram recuperação nesta faixa. O efeito matriz não foi relevante para a maioria dos analitos, ficando entre 70 e 120% para 78 micotoxinas em milho e 70 em ração. As fumonisinas estavam presentes em todas as amostras analisadas; a mediana da contaminação foi de 946 µg/kg; 427 µg/kg e 140 µg/kg nas amostras de milho, enquanto nas amostras de ração foi 185 µg/kg; 54 µg/kg e 27 µg/kg, para FB₁, FB₂ e FB₃, respectivamente. HFB₁ foi detectada em 10,5% das amostras de milho (mediana = 8,5 µg/kg). Oitenta e nove por cento das amostras de milho e 22% das ração estavam contaminadas com bovericina apresentando medianas de 11,3 µg/kg e de 3,6 µg/kg, respectivamente. Para as eniatinas a média de contaminação foi baixa. O percentual de contaminação por aflatoxinas e tricotecenos foi de 2,5 a 23,7% com médias próximas ao LOD do método. Para ZON, 23,7% das amostras de milho estavam contaminadas e 36,1% das amostras de ração (mediana de 0,95 µg/kg para ambos). Não foi observada diferença significativa com relação à quantidade de micotoxinas entre as etapas de limpeza por peneiração e de secagem no processamento do milho na fábrica de ração, porém, o produto de descarte da primeira limpeza apresentou os maiores níveis de contaminação em todas as micotoxinas avaliadas. Este é o primeiro relato de contaminação por agroclavina, canoclavina, eniatina A, A₁, B, bovericina e ácido cójico em amostras de milho e ração para frangos no Brasil. Este método mostrou ser rápido, sensível e seletivo para a análise de micotoxinas

Palavras chaves: Multimicotoxinas, metabólitos fúngicos, fumonisinas, agroclavina, canoclavina, Eniatina A, A₁, B, bovericina e ácido cójico.

Rio de Janeiro

Agosto de 2009

ABSTRACT

Simultaneous multi-mycotoxin determination in maize and poultry feeds from Brazil by liquid chromatography/tandem mass spectrometry

Maria de Lourdes Mendes de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Soares Costa

Abstract da Dissertação de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Química de Produtos Naturais,

Brazil is the third major corn producer country of the world and first in exports of chicken. Brazilian corn production is destined mainly for animal feed. Maize is a product susceptible to different fungal contamination. EC have been advanced to diminish maximum legal limits for mycotoxins. The objective of this study is to evaluate quantitatively mycotoxins that may be present in samples of maize and poultry feed produced in Brazil. A multi-mycotoxin method based on HPLC-MS/MS was applied to investigate the occurrence of toxic fungal metabolites in 119 samples collected from poultry feed factory integrated poultry farms: maize grain (74), maize by-product (9) and poultry feed (36). A total of 101 mycotoxins were investigated, twenty mycotoxins were detected and quantified: aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, fumonisins B₁, B₂ and B₃, hydrolyzed fumonisin B₁, zearalenone, agroclavine, chanoclavine, deoxynivalenol, nivalenol, enniatin A, A₁, B, B₁, beauvericin, kojic acid and moniliformin. Most samples were contaminated with more than one mycotoxin. The recovery was between 70 and 120% for 73 mycotoxins in maize, while 65 mycotoxins reach same recovery range in feed. The matrix effect was not relevant for most analytes, getting between 70 and 120% for 78 mycotoxins in maize and 70 in feed. All samples were contaminated with fumonisins, contamination medians were 946 µg/kg; 427 µg/kg and 140 µg/kg in maize samples, while 185 µg/kg; 54 µg/kg and 27 µg/kg in feed samples, for FB₁, FB₂ and FB₃ respectively. HFB₁ was detected in 10.5% of maize samples (median = 8.5 µg/kg). 89% of maize and 22% of feed samples were contaminated with BEA, the medians were 11.3 µg/kg and 3.6 µg/kg, respectively. The enniatins median contaminations were low. The percentage of aflatoxin and trichothecenes contamination was 2.5 to 23.7% with averages near to LOD. For ZON, 23.7% of maize samples were contaminated while 36.1% of feed (both median 0.95 µg/kg). No significant difference was observed concerning of mycotoxins amount between drying and sieving steps during corn processing in the factory, however, by-product of first cleaning presented highest contamination levels for all mycotoxins. This is the first study dealing with agroclavine, chanoclavine, enniatin A, A₁, B, B₁, beauvericin and kojic acid contamination of maize and poultry feeds from Brazil.

Key words: Multimycotoxin, fungal metabolites, fumonisin, agroclavine, chanoclavine, enniatin A, A₁, B, B₁, beauvericin and kojic acid

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiii
Capítulo 1: INTRODUÇÃO	1
Capítulo 2: OBJETIVOS.....	8
2.1 Objetivo Geral.....	9
2.1 Objetivos Específicos.....	9
Capítulo 3: REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3.1 Principais micotoxinas encontradas em alimentos	11
3.2 Aflatoxinas	11
3.2.1. Propriedades físico-químicas e mecanismo de ação das aflatoxinas.	12
3.2.2. Métodos de análise das aflatoxinas.....	17
3.3 Fumonisinias.....	18
3.3.1. Propriedades físico-químicas e mecanismo de ação das fumonisinias	19
3.3.2. Métodos de análise de fumonisinias.....	21
3.4 Tricotecenos	22
3.4.1. Propriedades físico-químicas e mecanismo de ação.....	23
3.4.2. Métodos de análise de tricotecenos	25
3.5 Zearalenona.....	27
3.5.1. Propriedades físico-químicas e mecanismo de ação da zearalenona.....	28
3.5.2. Métodos de análise de zearalenona.....	30
3.6 Ocratoxina A	32
3.6.1. Propriedades físico-químicas e mecanismo de ação.....	33
3.6.2. Métodos de análise de ocratoxina	35
3.7 Alcaloides de Ergot.....	37
3.7.1. Propriedades físico-químicas e mecanismo de ação dos Alcaloides de Ergot... ..	38
3.7.2. Métodos de análise dos alcaloides de Ergot.....	40
3.8 Outras Micotoxinas	41
3.8.1. Hexadepsipeptídios cíclicos	41
3.8.2. Moniliformina.....	42
3.8.3. Patulina	44
3.8.4. Citrinina.....	45
3.8.5. Toxinas de alternaria.....	46

3.9	O Milho no Brasil.....	48
3.9.1.	Ocorrência de aflatoxinas em milho no Brasil.....	50
3.9.2.	Ocorrência de fumonisinas em milho no Brasil.....	51
3.9.3.	Ocorrência de tricotecenos em milho no Brasil.....	52
3.9.4.	Ocorrência de zearalenona em milho no Brasil	54
3.9.5.	Ocorrência de ocratoxina A em milho no Brasil	54
3.10	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas	54
3.10.1.	Espectrometria de massas:	54
3.10.2.	EletroSpray.	57
3.10.3.	Analisador de massas tipo quadrupolo.....	58
3.11	Métodos multimicotoxinas	58
3.12	Efeito da Matriz	59
	Capítulo 4: PARTE EXPERIMENTAL	61
4.1	Material e Método	62
4.1.1	Reagentes Químicos e Padrões.....	62
4.1.2	Coleta das Amostras	63
4.1.3	Preparo da amostra.....	65
4.1.4	Extração das micotoxinas.....	65
4.1.5	Teste de recuperação.....	65
4.1.6	Parâmetros instrumentais.....	66
4.2	Avaliação de parâmetros.....	67
4.2.1	Avaliação da homogeneidade das subamostras e quantidade ideal de subamostra analítica a ser tomada para quantificação das toxinas em amostras naturalmente contaminadas.....	67
4.2.2	Avaliação do efeito matriz:	67
	Capítulo 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1	Avaliação da homogeneidade das subamostras e da quantidade ideal da subamostra analítica a ser tomada para quantificação	79
5.2	Teste de recuperação	81
5.3	Avaliação do efeito matriz	83
5.4	Contaminação com micotoxinas das amostras avaliadas.....	87
	Capítulo 6: CONCLUSÕES	98
	Refêrencias Bibliográficas	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química das principais aflatoxinas	13
Figura 2: Estrutura química da esterigmatocistina.	14
Figura 3: Biotransformação da aflatoxina B1	15
Figura 4: Estrutura química das principais fumonisinas.	20
Figura 5: Estrutura química dos principais tricotecenos.	24
Figura 6: Estrutura química da zearalenona e seus metabólitos.	29
Figura 7: Estrutura química das principais ocratoxinas.	34
Figura 8: Estrutura química dos principais alcaloides de Ergot.	39
Figura 9: Estrutura química dos hexappídios cíclicos.....	41
Figura 10: Estrutura química da moniliformina (MON).	43
Figura 11: Estrutura química da patulina (PAT).	44
Figura 12: Estrutura química da citrinina (CTN)	45
Figura 13: Estrutura química das toxinas de <i>Alternaria</i>	47
Figura 14: Cromatograma de íons totais no modo negativo da mistura de padrões de 21 micotoxinas obtido por CLAE-EM/EM (ESI).	74
Figura 15: (A) Cromatograma de íons totais no modo positivo da mistura de padrões de 80 micotoxinas obtido por CLAE-EM/EM (ESI). (B) Espectro de massas referente ao período selecionado e os picos referentes às duas transições de FB1: (C) uma de quantificação (722,5→352,3) e (D) outra de confirmação (722,5→334,4).....	77
Figura 16: Esquema de fragmentação da FB ₁	78
Figura 17: Comparação das três curvas obtida para avaliação do efeito da matriz na análise de FB1 em milho (A) e ração (B).	84
Figura 18: Comparação das três curvas obtida para avaliação do efeito da matriz na análise de AFB ₁ em milho (A) e ração (B).	84
Figura 19: Cromatograma de íons totais no modo positivo da amostra de milho obtido por CLAE-EM/EM (ESI)..	88
Figura 20: Cromatograma de íons totais no modo negativo da amostra de milho obtido por CLAE-EM/EM (ESI)..	88
Figura 21 Cromatograma de íons totais no modo positivo da amostra de ração obtido por CLAE-EM/EM (ESI)..	89
Figura 22: Cromatograma de íons totais no modo negativo da amostra de ração obtido por CLAE-EM/EM (ESI)..	89
Figura 23: Padrão de fragmentação espectral de massas para Eniatinas B, B1, B2, B3 e B4 (VISCONTI et al., 1992).	93
Figura 24: (A) Cromatograma de íons totais no modo positivo da amostra M 18 obtido por CLAE-EM/EM (ESI). (B) O sinal da agroclavina referente a transição de quantificação (239,1→183,2) e (C) de confirmação (239,1→208,2). (D) Esquema de fragmentação da agroclavina.	94
Figura 25: (A) Cromatograma de íons totais no modo positivo da amostra M 18 obtido por CLAE-EM/EM (ESI). (B) O sinal da agroclavina referente a transição de quantificação (239,1→183,2) e (C) de confirmação (239,1→208,2). (D) Esquema de fragmentação da agroclavina.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas das principais aflatoxinas.....	13
Tabela 2: Valores da dose média para a produção de tumores (DT_{50}) após ingestão prolongada de aflatoxina B_1 (AFB_1) na dieta, para diversas espécies de animais.	16
Tabela 3: Valores de LD_{50} intraperitoneal de alguns tricotecenos para ratos.....	25
Tabela 4: Concentrações dos padrões nas soluções estoque de trabalho final.....	64
Tabela 5: Parâmetros otimizados para obtenção do espectro de massas com ionização por eletronspray (IES-EM/EM)	69
Tabela 6: Relação das 21 micotoxinas analisadas no modo negativo de acordo com a ordem de eluição, tempo de retenção e com as respectivas transições de quantificação e qualificação analisadas.	74
Tabela 7: Relação das 80 micotoxinas analisadas no modo positivo de acordo com a ordem de eluição, tempo de retenção e com as respectivas transições de quantificação e qualificação analisadas.	75
Tabela 8: Resultados das médias da repetibilidade, desvio padrão e padrão relativo de repetibilidade (RSD_r) para diferentes quantidades de tomada de amostra para quantificação de FB_1 , FB_2 e FB_3 em amostras de milho naturalmente contaminadas.	80
Tabela 9: Limite de detecção (LOD), nível de contaminação (NC) e recuperações das micotoxinas em milho e em ração.....	82
Tabela 10: Resultados obtidos do efeito matriz, recuperação aparente e eficiência de extração nos três níveis de contaminação (NC) avaliados.	85
Tabela 11: Resultados da contaminação de micotoxinas nas amostras de milho e de ração de aves: faixa de contaminação, média e número de amostras contaminadas (percentual entre parêntesis)	92
Tabela 12: Média da contaminação com micotoxinas encontradas em amostras de milho coletadas durante o processamento na fábrica de ração avícola.	97
Tabela 13: Resultado da análise da variância ANOVA das micotoxinas fumonisinas e bovericina nas quatro etapas do processamento do milho ($\alpha = 0,05$)... 97	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFs	Aflatoxinas
ACN	acetonitrila
AcOH	Ácido acético
AFB	Aflatoxina B
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AP ₁	Aminopentol
APCI	Ionização química a pressão atmosférica (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
API	Ionização a pressão atmosférica (Atmospheric Pressure Ionization)
APPI	Fotoionização a pressão atmosférica (Atmospheric Pressure Photoionization)
ATA	Aleucia tóxica alimentar
BEA	Bovericina
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CIA	Coluna de Imunoafinidade
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAS	Diacetoxiscirpenol
DCE	Detector de captura de elétrons
DFL	Detector de Fluorescência
DL ₅₀	Dose Letal a 50% dos animais
DON-1	Deepoxidesoxinivalenol
DON	Desoxinivanelol
3-/15-AcDON	3-/15-acetildesoxinivalenol
DT ₅₀	Produção de tumores em 50% dos animais
EA	Eniatina A
EA ₁	Eniatina A ₁
EB	Eniatina B
EB ₁	Eniatina B ₁
EB ₃	Eniatina B ₃
EC	Eletroforese capilar
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EM	Espectrômetro de Massas
ESI	Ionização por eletrospray (Eletrospray ionization)
FB ₁	Fumonisina B ₁
FB ₂	Fumonisina B ₂
FB ₃	Fumonisina B ₃
FDA	Food and Drug Administration
F-X	Fusarenona X
HFB ₁	Fumonisina B ₁ completamente hidrolisada (AP ₁ – Aminipentol)
HT-2	Toxina HT-2
LEME	Leucoencefalomalácia
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MAS	Monoacetoxiscirpenol
MeOH	Metanol
MON	Moniliformina
MPA	Ácido micofenólico
MRM	Monitoramento Múltiplo de Reações (Multiple reaction monitoring)
NanoESI	Ionização Nano electrospray
NEO	Neosolaniol
NIV	Nivalenol
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B

OTC	Ocratoxina C
OT α	Ocratoxina α
OT β	Ocratoxina β
ppb	Parte por bilhão
ppt	Parte por trilhão
QTrap	Combinação de triplo quadrupolo e analisador íon trap
RNA	Ácido ribonucléico
RP	Fase reversa (Reverse Phase)
rpm	Rotações por minuto
RSD _r	Desvio Padrão Relativo de Repetibilidade (<i>relative standard deviation</i>)
SD	Síndrome Distérmica
SFC	Cromatografia de fluido supercrítico
SFE	Extração com fluido supercrítico
SIM	Monitoramento seletivo de íons
sol.	Solução
SPE	extração em fase sólida (solid phase extraction)
SRM	Monitoramento seletivo de reação (Selected reaction monitoring)
ST	Esterigmatocistina
T-2	Toxina T-2
TCT	Tricoceteno
TFA	Ácido trifluoroacético
TSP	Termospray
UPLC	Ultra-Pressure Liquid Chromatography (cromatografia líquida de ultra- pressão)
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
VER	Verrucarol
WHO	World Health Organization
ZON	zearalenona
α -ZOL	α -zearalenol
β -ZAL	β -zearalanol
[M+H] ⁺	íon pseudomolecular no modo positivo
[M-H] ⁻	íon pseudomolecular no modo negativo

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A palavra micotoxina deriva do grego *Mikes*, que significa fungo, e do latim *Toxicum*, que corresponde a veneno. Essas toxinas são metabólitos secundários produzidos, principalmente, por fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, os quais podem contaminar e se desenvolver em uma grande variedade de alimentos, desde a plantação e colheita até o transporte e o armazenamento (SCUSSEL, 1998).

Apesar do envenenamento causado pelo consumo de alimentos contaminados por fungos do gênero *Claviceps* seja conhecido desde a Idade Média como “fogo de Santo Antônio” ou Ergotismo (devido à ingestão de Alcaloides de Ergot), cujos sintomas eram alucinações e membros inchados com sensações ardentes, com necrose subsequente que conduz a perda de apêndices, (CAST, 2003), somente no começo dos anos 60 foi identificada à primeira micotoxina responsável pela morte de 100.000 perus na Inglaterra: a aflatoxina. As necropsias demonstraram sempre lesões necróticas no fígado e congestão dos rins, bem como a proliferação dos ductos biliares. Essa mortalidade, após várias suposições, foi finalmente relacionada a uma intoxicação causada pelas rações utilizadas na alimentação dos animais, que continham torta de amendoim importada do Brasil altamente colonizada por *Aspergillus flavus*. As toxinas extraídas e isoladas deste fungo, que reproduziram intoxicação semelhante nos animais estudados, foram identificadas e denominadas aflatoxinas B e G, devido coloração da fluorescência em placa de cromatografia em camada delgada, azul (blue) e verde (green), respectivamente (ASAO *et al.*, 1963).

A partir de então, a pesquisa por estas substâncias, que causam tanto risco a saúde dos homens e animais, se desenvolveu e atualmente, já foram isoladas e quimicamente identificadas mais de 300 micotoxinas. Devido as suas estruturas químicas serem muito diferentes as micotoxinas podem causar uma gama diversa de efeitos tóxicos. Por isso, estas substâncias podem ser responsáveis por perdas econômicas significativas associadas ao seu impacto na saúde humana, na produtividade no animal e comércio doméstico e internacional. A exposição à micotoxinas pode produzir efeitos tóxicos agudos e crônicos, variando desde a morte a efeitos deletérios no sistema imunológico, nas funções hepáticas e renais, no sistema nervoso central e no trato digestivo. Estas substâncias podem ainda ser carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras. Porém, efeitos agudos devido à ingestão de altas quantidades de toxina presentes no alimento, normalmente estão restritos às partes

menos desenvolvidas, onde os recursos para controle são limitados (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

Várias doenças endêmicas na Ásia, África e Europa são agora correlacionadas à intoxicações agudas por micotoxinas, tais como as síndromes de Reyes e Kwarshiorkor (lesões no fígado e rins causadas por aflatoxinas) e nefropatia endêmica de Balcan (tumores no trato urinário superior causado por ocratoxina A (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). O béri-béri cardíaco agudo ou kakkei de ishoshin, uma doença que aconteceu no início do século vinte no Japão e outros países asiáticos, foi caracterizado através de palpitações, náusea, vômito, taquicardia, pressão baixa, inquietude e problemas neurológicos que conduzem à dificuldade respiratória e morte. A doença foi considerada como uma infecção ou avitaminose até que o fungo *Penicillium citreonigrum* e a micotoxina citreoviridina foram isolados e identificados. A melhoria na dieta e o aumento da fiscalização e controle fizeram o béri-béri cardíaco de pouca importância em tempos modernos (CAST, 2003). Porém, em 2006, um novo surto foi identificado na cidade de Imperatriz e proximidades, no Maranhão. Após 51 óbitos e estudos epidemiológicos que diagnosticaram mais de 600 pessoas com tais sintomas, um grupo interministerial foi formado e verificou-se uma grande contaminação por *Penicillium citreonigrum* no arroz consumido pela população e que estava armazenado úmido e em péssimas condições (Nota Técnica, 2408).

Em muitos casos, as micotoxinas são formadas ainda no campo; porém, elas podem também ser formadas ou sua concentração ser aumentada durante colheita, secagem e armazenamento. A disponibilidade de água é o fator mais importante neste processo de produção de micotoxinas para crescimento do fungo produtor. Porém, a temperatura é também um fator importante. Assim, no campo, quando a interação entre a planta e o fungo se estabelece, a umidade e a temperatura afetam o crescimento da planta e a competitividade do fungo micotoxigênico. No armazenamento de grãos, fatores como a atividade de água, aeração, temperatura do substrato, concentrações do inóculo, interações microbianas, dano mecânico e infestação por insetos podem ser agravantes na contaminação por micotoxinas. (CAST, 2003)

A maioria das micotoxinas tem considerável estabilidade química e térmica. Por isso não podem ser removidas ou são apenas removidas parcialmente pelo processamento dos alimentos ou por outros procedimentos de descontaminação disponíveis. Atualmente, as aflatoxinas (AF), tricotecenos, ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZON), fumonisinas, moniliformin (MOM) e patulina (PAT) recebem sem dúvida uma grande atenção devido a sua

frequente ocorrência e seus efeitos nocivos à saúde humana e animal. Os fatores que contribuem para sua presença ou produção em alimentos e ração incluem: armazenamento, condições ambientais, como temperatura e umidade relativa do ar, o substrato e o uso de fungicidas, embora as interrelações entre todos esses fatores não sejam ainda bem compreendidas e a produção de toxinas não podem ser previstas (HUSSEIN e BRASEL, 2001). Vale ressaltar que a presença de um fungo reconhecidamente produtor de micotoxina não evidencia a presença da toxina associada automaticamente, pois muitos fatores estão envolvidos na sua formação. Reciprocamente, a ausência de fungos não garante a ausência de micotoxinas, pois os fungos podem ser eliminados, por exemplo, pelo calor, mas não as micotoxinas.

O Brasil é o terceiro exportador mundial de milho e o primeiro em exportação de frangos (IBGE, 2008a e b). Cerca de 75% da produção de milho é destinado ao mercado de ração para avicultura de corte e suinocultura (PINAZA, 2007). O milho é um produto suscetível ao risco de contaminação por várias espécies de fungos e, conseqüentemente, diversas micotoxinas. Estudos sobre a incidência de micotoxinas no Brasil, nos últimos 10 anos, revelam que a contaminação por aflatoxinas em milho é pequena e ocasional. Entretanto, é alta a contaminação por fumonisinas em milho e produtos a base de milho (RODRIGUEZ-AMAYA e SABINO, 2002). Contaminações com outras micotoxinas, tais como zearalenona, ocratoxina A, ácido ciclopiazônico, esterigmatocistina, moniliformina, desoxinivalenol e toxina T-2 não mostraram ser relevantes no milho brasileiro neste levantamento, porém existem poucos estudos no Brasil sobre essas e outras micotoxinas, principalmente aquelas que estão fora da legislação da Comunidade Européia.

A contaminação por micotoxinas é um problema em todo o mundo. Estimativas mostram que 25% de produção agrícola mundial e 20% da produção agrícola na União Europeia podem estar contaminadas com micotoxinas (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). No Brasil, as perdas pós-colheita correspondem a aproximadamente de 4 a 40% da produção dependendo da cultura, porém não há dados se estas perdas são relativas à contaminação fúngica ou provenientes de outros tipos de perda (IBGE, 2008). Perdas econômicas relativas a este problema são incalculáveis incluindo tanto a redução na produção agropecuária e aumento nos custos com a saúde humana e animal, como também custos relativos à legislação e fiscalização. A situação é considerada menos crítica na Europa e América do Norte devido a razões técnicas educacionais e climáticas. As autoridades de muitos países têm tomado medidas para monitorar e controlar os níveis de micotoxinas, especialmente em produtos

agrícolas importados de países do terceiro mundo. Em muitos países as diretrizes e os níveis máximos de tolerância já foram estabelecidos para aflatoxinas, OTA, ZON e desoxinivalenol (DON) em níveis menores que ppb (ng/g) ou ppt (ng/μg) em diferentes produtos para alimentação humana e em ração animal (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

O controle de micotoxinas é atualmente realizado através dos processos de controle de qualidade de alimentos e procedimentos reguladores. Muitos países já estabeleceram níveis máximos de contaminação, principalmente para as aflatoxinas, em alimentos e rações animais (Van Egmond, 1995). O monitoramento de micotoxinas para assegurar que os alimentos não estejam contaminados acima dos limites permitidos requer métodos analíticos sensíveis, simples e rápidos, estando plenamente inserido no contexto de segurança de alimentos. Um método para análise de micotoxinas em grãos deve ser simples, rápido, robusto, preciso e seletivo, e em muitos casos ser capaz de determinação simultânea de várias toxinas. Acima de tudo, baixos níveis de tolerância em alimentos e rações requerem métodos sensíveis.

Orientados por autoridades reguladoras, como a Comissão Europeia e o FDA (Food and Drug Administration), esforços analíticos tem sido feitos para desenvolver análises seguras e rápidas em grande número de amostras visando atender propostas de vigilância e monitoramento a níveis de ppb e ppt em uma vasta variedade de alimentos complexos. Especialmente para as aflatoxinas, que são altamente tóxicas e carcinogênicas, já estão comercialmente disponíveis métodos de análises rápidos e altamente sensíveis baseados em métodos imunquímicos. Kits de análise, facilmente aplicáveis e automatizados, estão disponíveis para algumas micotoxinas, dentre elas AFT, OTA, DON e ZON, possibilitando a avaliação em grãos e algumas matrizes complexas citadas nos protocolos ou previamente avaliadas. Neste contexto a cromatografia acoplada à detectores com diferentes princípios é usada para confirmar amostras positivas com segurança e capazes de quantificar precisamente quando o nível máximo de tolerância ou recomendações são excedidos. Dependendo da natureza da micotoxina, diferentes métodos analíticos são realizados, como cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (CG-DCA) para tricotecenos e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-DF) para AFs, ZON, OTA e fumonisinas. Vários protocolos para purificação de amostras foram estabelecidos visando remover eficientemente os interferentes da matriz do alimento ou ração e/ou concentrar o analito alvo, ou seja, a micotoxina alvo (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

Todos os procedimentos de detecção de micotoxinas em lotes de alimentos devem incluir uma amostragem adequada devido à grande heterogeneidade na contaminação. A

Comunidade Europeia especifica diretrizes com planos de amostragem para fiscalização (REGULAMENTO (CE) N.º 401/2006). Entretanto, ainda existe a necessidade de harmonizar planos de amostragem efetivos, geralmente grandes quantidades de amostras chegam aos laboratórios de análise onde serão trituradas em pequenos moinhos. Alguns métodos sugerem a adição de uma parte de água para formar uma pasta aquosa e homogeneizar melhor a amostra. A maioria dos métodos de análises parte de 20 a 100 g de amostra, entretanto, com a sofisticação e aumento de sensibilidade dos métodos, esta quantidade pode ser reduzida para até 0,5g (SULYOK *et al.*, 2007a). Geralmente são utilizados solventes polares para a extração (metanol, acetonitrila, acetato de etila,...) misturados com uma parte de água, de acordo com a solubilidade da toxina. Esses extratos podem ser utilizados diretamente em análises baseadas em métodos imunológicos ou serem purificados ou concentrados para posterior análise cromatográfica. Entre alguns exemplos de purificação dos extratos pode-se citar: partição líquido-líquido, extração em fase sólida (SPE), colunas cromatográficas e colunas de imunoafinidade (IAC). Alguns métodos utilizam mais de um procedimento de purificação do extrato para remoção dos interferentes antes da quantificação da micotoxina (KRSKA *et al.*, 2005).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a vários tipos de detectores tornou-se a principal ferramenta analítica para análise de micotoxinas. Embora existam métodos robustos validados para análise de desoxinivalenol (DON) e outros tricotecenos em cereais por cromatografia gasosa (CG), praticamente todas as micotoxinas são rotineiramente separadas e detectadas por CLAE. Atualmente, um grande potencial para o uso analítico do cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo (CLAE-EM/EM) tem sido demonstrado para a análise de várias micotoxinas simultaneamente em vários tipos de amostra (KRSKA *et al.*, 2005).

Devido à grande variedade estrutural das micotoxinas assim como a possibilidade de sua coocorrência em matérias-primas e produtos processados (como ração e alimentos para consumo humano) a CLAE-EM/EM tornou-se a ferramenta analítica emergente de grande importância na análise dessas substâncias em matrizes com tal complexidade. Atualmente existem vários métodos multianalito baseados nesta técnica (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). Em contraste com a grande maioria dos métodos analíticos para micotoxinas descritos, que abrangem somente uma pequena fração desses metabólitos, ou métodos baseados na cromatografia em fase gasosa, que necessitam de derivatização, a CLAE-EM/EM oferece alta sensibilidade e seletividade e permite a análise rápida da presença de micotoxinas que

difícilmente seriam investigadas isoladamente, com inequívoca identificação e confirmação estrutural. Entre as vantagens da CLAE-EM/EM podemos citar: baixos limites de detecção, a capacidade de fornecer informações estruturais dos analitos, o tratamento mínimo da amostra e a possibilidade de cobrir uma gama extensiva de analitos com diferentes polaridades. Os Espectrômetros de Massas (EM) são detectores universais que não dependem das características químicas das substâncias como absorvância no UV ou fluorescência. O efeito da matriz, no entanto, limita o potencial analítico do CLAE-EM uma vez que a supressão iônica pode ocorrer devido a componentes da matriz que coeluem com o analito de interesse. O emprego de padrões internos, quando disponíveis, pode amenizar este efeito, além do uso de padrões adicionados às matrizes e cuidadosa validação das combinações toxina/matriz para determinar exatamente o efeito matriz.

A alta seletividade oferecida pelo espectrômetro de massas triplo quadrupolo permite a inequívoca identificação de analitos em matrizes complexas, sendo, por isso, a principal ferramenta analítica para a análise e confirmação de micotoxinas em alimentos. Além disso, a principal vantagem do método escolhido para realizar as análises, validado inicialmente para 39 micotoxinas em trigo e milho (SULYOK *et al.*, 2006) e expandido para 87 (SULYOK *et al.*, 2007a), permite a quantificação simultânea utilizando um único passo de extração seguido por LC-ESI-MS/MS sem a necessidade de laboriosas etapas de purificação da amostra separadamente para cada analito.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta tese é avaliar quantitativamente as micotoxinas que podem estar presentes em amostras de milho e ração para frango por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas tandem (CLAE-EM/EM).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Avaliar a recuperação e o efeito da matriz nas amostras de milho e ração para frango pelo método por CLAE-EM/EM.

2 – Avaliar a contaminação por micotoxinas nas etapas de limpeza por peneiração e secagem no processamento do milho na fábrica de ração.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PRINCIPAIS MICOTOXINAS ENCONTRADAS EM ALIMENTOS

A área da micotoxicologia vem avançando muito desde a descoberta das aflatoxinas nos anos 60, não somente na descoberta e ocorrência de outras micotoxinas como também na toxicologia, epidemiologia, controle de fungos e detoxificação de alimentos e, principalmente no desenvolvimento de métodos rápidos e seguros de análise de alimentos e matriz biológica para assegurar a segurança alimentar e atender as especificações das legislações que estabelecem limites máximos cada vez menores (CAST, 2003; ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

Os metabólitos tóxicos produzidos por fungos podem ser milhares. Apesar do número total destes metabólitos não ser conhecido, o número de micotoxinas que conhecidamente estão envolvidas em doenças é consideravelmente menor, mas mesmo este número é difícil de estimar devido à diversidade dos efeitos de uma única substância no sistema animal (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

Dentre as principais classes de micotoxinas estudadas podemos citar: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, zearalenona, tricotecenos, toxinas do Ergot, hexapeptídios e toxinas de *Alternaria*, entres outras. Neste capítulo, encontra-se uma pequena revisão das micotoxinas analisadas e dos métodos de análise, em especial por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

3.2 AFLATOXINAS

As aflatoxinas estão entre as micotoxinas mais estudadas não somente por ter sido as primeiras micotoxinas a terem suas estruturas elucidadas, mas, principalmente por apresentarem maior ação tóxica, carcinogênica e mutagênica quando comparada a outras substâncias.

As aflatoxinas foram assim designadas por serem produzidas principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus*, porém outras espécies podem ser produtoras: *Aspergillus parasiticus* e ocasionalmente por *A. nomius* e *A. pseudotamarii*. O *A. flavus* produz apenas aflatoxinas do grupo B, enquanto as espécies *A. parasiticus* e *A. nomius* produzem aflatoxina dos grupos B e G (CAST, 2003). Estas foram as primeiras micotoxinas a serem identificadas como potencialmente prejudiciais à saúde, quando 100.000 perus de 4 a 6 semanas de idade morreram na Inglaterra por necrose aguda do fígado após consumirem ração contendo

amendoim procedente do Brasil. A doença inicialmente chamada *Turkey X Disease*, desaparecia quando a ração, altamente contaminada por *Aspergillus flavus* e, conseqüentemente por aflatoxinas, era substituída (ASSAO *et al.*, 1963).

Os quatro principais metabólitos foram identificados como B₁ e B₂, por apresentarem fluorescência azul quando observados sob luz ultravioleta em 365nm em placa de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), e G₁ e G₂, por apresentarem fluorescência esverdeada (ASAO *et al.*, 1963). Posteriormente, outros dois metabólitos foram detectados no leite, em urina e fezes de mamíferos, resultantes do metabolismo das B₁ e B₂, sendo denominados M₁ e M₂ (CAST, 2003).

Vários fatores estão relacionados com a produção de aflatoxinas. Entre os fatores climáticos os mais importantes são a temperatura e o teor de umidade. Alguns autores reportam que a temperatura ideal que envolve o crescimento de fungos e a produção de aflatoxinas está entre 25° a 35°C, entretanto, a presença de alguns gêneros de fungos como o *Aspergillus* nem sempre é evidência positiva da produção de toxinas (SCUSSEL, 1998).

O grupo das aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e a AFM₁) foi classificado no Grupo 1, pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1993; IARC, 2002). De acordo com essas publicações os estudos experimentais realizados indicaram evidências suficientes de carcinogenicidade da ocorrência natural de aflatoxinas totais e das aflatoxinas B₁, G₁ e M₁; evidência limitada para a aflatoxina B₂ e evidência inadequada para a aflatoxina G₂.

3.2.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECANISMO DE AÇÃO DAS AFLATOXINAS.

A estrutura química do grupo das aflatoxinas é caracterizada pela ligação de núcleos de dihidrofurano ou tetrahydrofurano a uma estrutura cumarínica (responsável pelo efeito anti-coagulante); todas possuem um núcleo cumarínico associado com furanolactona. As aflatoxinas do grupo B possuem anel ciclopentenona e as do grupo G, lactona insaturada, enquanto as do grupo M são derivados hidroxilados de B₁ e B₂. As estruturas das principais aflatoxinas estão representadas na Figura 1.

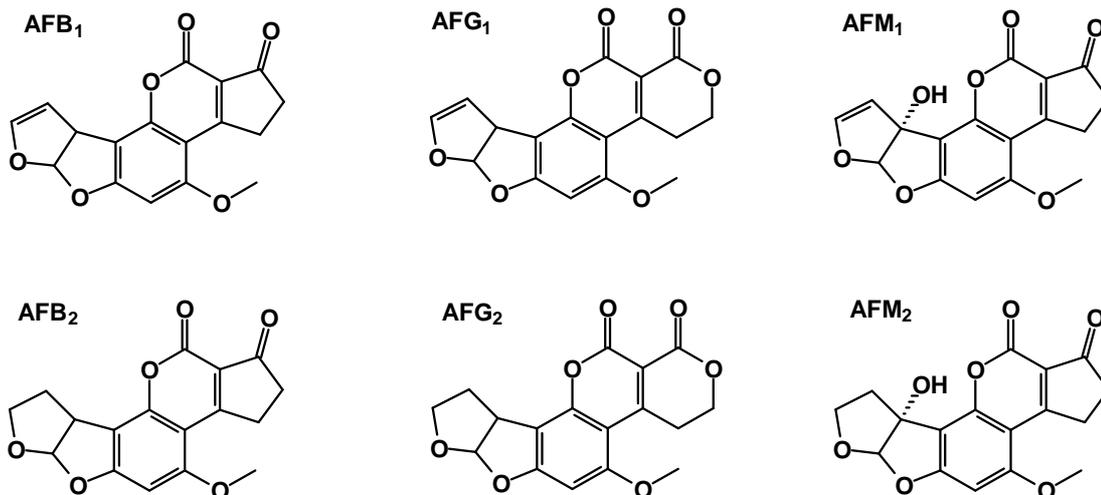


Figura 1: Estrutura química das principais aflatoxinas

Em estado puro, as aflatoxinas são extremamente estáveis em altas temperaturas, quando aquecidas em presença de ar superando até 200°C e não são afetadas pelo frio. São relativamente instáveis, quando expostas à luz, e particularmente à radiação UV, ao ar sobre placa de cromatografia de camada delgada (CCD) e ainda quando dissolvidas em solventes altamente polares. São solúveis e estáveis, quando em clorofórmio ou benzeno e mantidas sobre refrigeração e ao abrigo de luz. São destruídas totalmente na presença de soluções fortemente alcalinas, como a amônia e o hipoclorito. Além disso, são incolores, inodoras e não alteram o sabor dos alimentos (PÁDUA; SILVEIRA; MARTINS, 2002). A Tabela 1 apresenta as principais características físico-químicas das aflatoxinas de maior importância em saúde humana e animal (OPAS, 1983; BAGGIO, 2006).

Tabela 1: Características físico-químicas das principais aflatoxinas (OPAS, 1983).

Aflatoxina	Fórmula química	Massa molecular	Temperatura de fusão (°C)	Emissão de fluorescência sob luz UV (nm - cor)
AFB ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269	425 - azul
AFB ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	425 - azul
AFG ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	450 - verde
AFG ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	450 - verde
AFM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	425 - violeta azulada
AFM ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	425 - violeta
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230-234	425

A esterigmatocistina (ST), um precursor das aflatoxinas, é uma micotoxina caracterizada pelo núcleo xantona fundido a um núcleo diidrofurano ou tetraidrofurano que também possui ação tóxica e carcinogênica (SWEENEY e DOBSON, 1999). Sua estrutura química está representada na Figura 2.

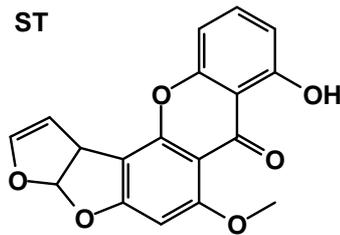


Figura 2: Estrutura química da esterigmatocistina.

De acordo com a revisão realizada por OLIVEIRA e GERMANO, 1997 as aflatoxinas são facilmente absorvidas pelo trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado. A mais encontrada em produtos destinados à alimentação é a aflatoxina B₁. Esta é metabolizada pelo complexo enzimático do retículo endoplasmático de células hepáticas denominadas oxidases de função mista, produzindo derivados. Um destes é a aflatoxina M₁, encontrada no leite proveniente de animais que ingeriram ração contaminada. Outro derivado resultante do metabolismo é o AFB₁-8,9-epóxido, altamente carcinogênico. Por ser bastante eletrofílico, se liga covalentemente a vários locais nucleofílicos da célula como os ácidos nucleicos (RNA, DNA) e proteínas (metionina, cisteína e histidina). Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas. A AFB₁-epóxido pode também ser conjugada enzimaticamente com glutathione reduzida, através de glutathione-S-transferases, constituindo importante via de detoxificação deste composto. A ligação da AFB₁-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB₁. A formação de adutos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N₇, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53. A ocorrência deste tipo de alteração é característica de vários carcinomas no homem, sobretudo o hepático. Estudos efetuados em fígados de ratos demonstraram que os adutos AFB₁-N₇-guanina podem ser retirados após a sua formação, deixando sítios apurínicos na molécula de DNA. Os sítios vagos tendem a ser preenchidos com adenina, resultando em transversão de guanina para timina, o que origina um ponto de mutação bastante significativo. Os adutos de DNA, depois de sofrerem depurinação espontânea, podem ser conjugados e excretados, sobretudo através da urina. Um esquema com as principais vias de biotransformação pode ser observado na Figura 3.

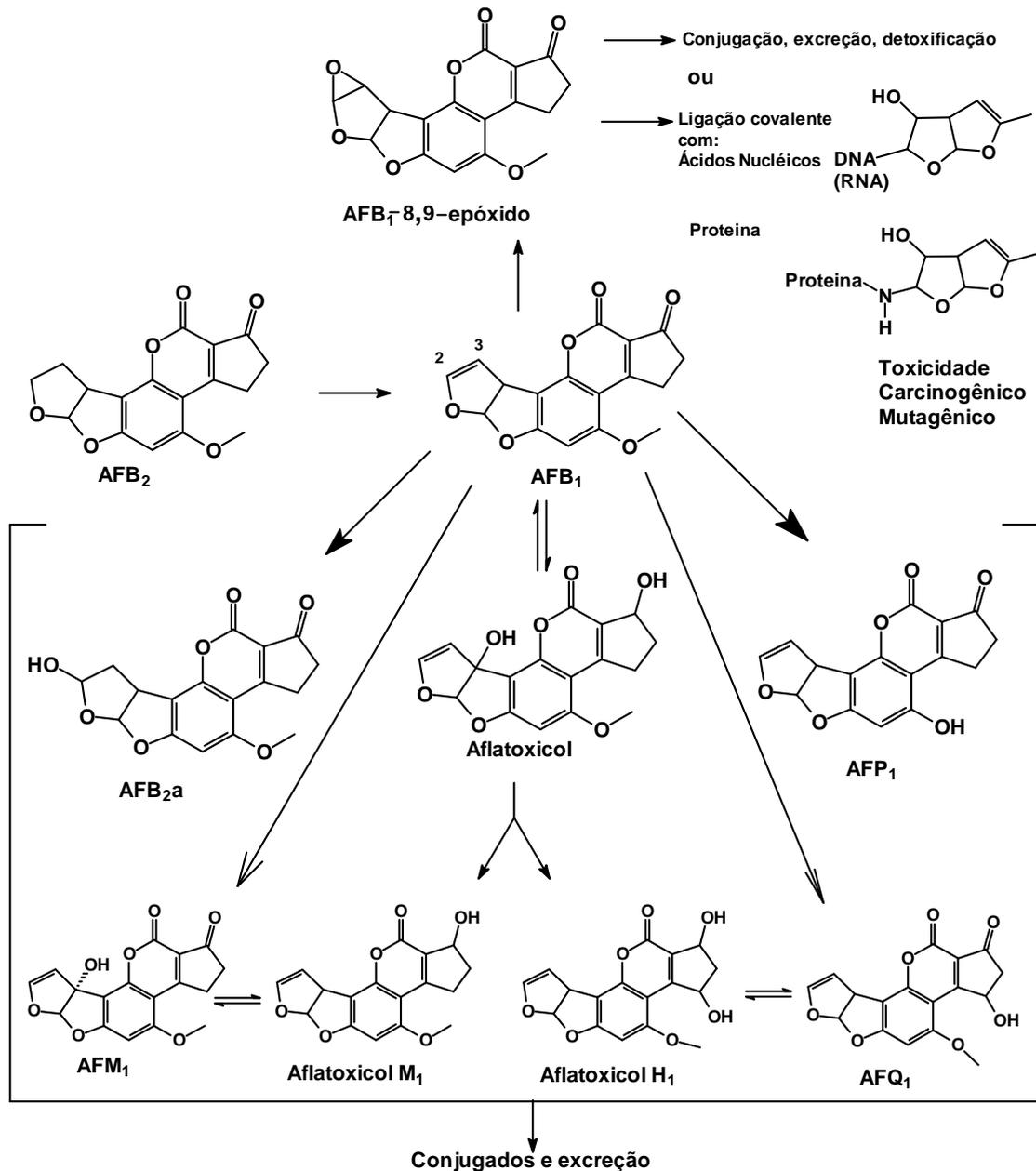


Figura 3: Biotransformação da aflatoxina B₁ (Fonte: BIEHL e BUCK, 1987; BAGGIO, 2006).

De acordo com STOLOFF (1987), a comprovação científica do envolvimento das aflatoxinas na etiologia do câncer hepático, no homem, é dificultada pelo fato de que, em sua grande maioria, os estudos epidemiológicos foram realizados em áreas onde a infecção pelo vírus da hepatite B é endêmica e, também, correlacionada à incidência do carcinoma hepatocelular. A dose média para a produção de tumores (DT₅₀) no homem é igual a 132 mg/kg/dia. Este valor está próximo da DT₅₀ observada em algumas espécies de primatas, porém é consideravelmente superior às das espécies de roedores mais sensíveis. Entretanto, deve-se ressaltar que a DT₅₀ para o homem é teórica, uma vez que, para seu cálculo, foram

assumidas várias condições, entre elas, a de que a aflatoxina B₁ seja a única causa do carcinoma hepatocelular e que a exposição a este carcinógeno tenha ocorrido continuamente durante cerca de 50 anos da vida do indivíduo (WOGAN, 1992).

A dose efetiva de AFB₁ ingerida para a indução de tumores hepáticos varia amplamente entre as espécies (Tabela 2), de modo similar ao que ocorre em relação à toxicidade aguda. Peixes e aves são extremamente sensíveis, e a dose efetiva para a indução de hepatomas situa-se entre 10 - 30 µg/kg de AFB₁ na dieta. Contudo, a sensibilidade é particularmente variável entre os roedores, sendo que os ratos respondem nos níveis de 15 - 1.000 µg/kg de AFB₁ na dieta, enquanto que certas cepas de camundongos não apresentam nenhuma resposta em doses de até 150.000 µg/kg. Para a maioria das espécies estudadas, a sensibilidade é acentuadamente maior nos machos do que nas fêmeas. A comparação quantitativa da potência carcinogênica da AFB₁ entre as espécies animais pode ser facilitada pelo cálculo estatístico da dose média para a produção de tumores (DT₅₀), pelo método de Gold e col.16, expressa em µg/kg p.c./dia.

Tabela 2: Valores da dose média para a produção de tumores (DT₅₀) após ingestão prolongada de aflatoxina B₁ (AFB₁) na dieta, para diversas espécies de animais (adaptado de WOGAN, 1992).

Animal	DT₅₀ (µg/kg p.c./dia)
Rato Fisher macho	1,3
Rato Fisher fêmea	7,5
Rato Wistar macho	5,8
Rato Wistar fêmea	6,9
Rato Porton macho	3,1
Rato Porton fêmea	12,5
Camundongos	> 70
Macaco Rhesus	156
Macaco Cynomolgus	848

As aflatoxinas são imunossupressoras, carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas. Os sintomas proeminentes de aflatoxicoses em várias espécies incluindo mamíferos são hipolipidemia, hipocolesterolemia e hipocarotenemia associados com esteatose hepática severa e perda de peso. Pode provocar cirrose, necrose do fígado, proliferação dos canais biliares, síndrome de Reye (encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragia nos rins e lesões sérias na pele, pelo contato direto. Além disso, os produtos do seu metabolismo interferem com o sistema imunológico da pessoa ou do animal. A natureza precisa da resposta vai depender de vários fatores como espécie animal, idade, sexo e estado nutricional (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

3.2.2.MÉTODOS DE ANÁLISE DAS AFLATOXINAS.

Atualmente estão disponíveis comercialmente kits rápidos e fáceis de usar, como o teste ELISA (Ensaio imunoenzimático - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para quantificação de vários tipos de micotoxinas. A quantificação de aflatoxinas é predominantemente feita por cromatografia líquida com detector de fluorescência (CLEA/DFL). Devido à excelente fluorescência natural das aflatoxinas, limites de detecção em faixas abaixo de ppt podem ser facilmente atingidos quando iodeto ou brometo são adicionados via pós-coluna para aumentar a sensibilidade do método. A purificação das amostras com colunas de imunoafinidade (CIA) mostrou ter um grande potencial no aumento da sensibilidade e especificidade do método pelo aumento seletivo e isolamento da aflatoxina alvo (PAPP, H-OTTA e ZARAY, 2002). A combinação de CLAE com CIA tornou-se um método de referência para a determinação de AFLs em alimentos e rações. (SOGSERMSAKUL e RAZZAZI-FAZELI, 2008).

Quase todas as separações por CLAE são realizadas em materiais de fase inversa aplicando misturas de metanol/água e acetonitrila/água como fase móvel em modo gradiente ou isocrático. Em alguns casos, ácido acético, ácido fórmico, ácido trifluoroacético (TFA) e sais de amônio são adicionados a fim de manter a ionização do analito e para melhorar a eficiência da separação cromatográfica. Normalmente, metabólitos e adutos de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, e AFM₂ são bem separados nestas condições com tempos de corrida cromatográfica entre 10 e 25 min. Quando as amostras são dissolvidas em metanol ou acetonitrila puros, podem ser observados alargamentos de picos devido ao alto poder de eluição de soluções orgânicas comparadas com fases móveis aquosas (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

Em geral, todas as aflatoxinas exibem boa eficiência de ionização por eletrospray (eletrospray ionization - ESI) no modo positivo do que a ionização química a pressão atmosférica (atmospheric pressure chemical ionization - APCI) com abundância de moléculas protonadas [M+H]⁺ e adutos iônicos de sódio, mas praticamente sem fragmentação no espectro de varredura. Neste contexto, a formação de íons adutos de sódio pode ser facilmente suprimida pela adição de íons de amônio na fase móvel levando a uma melhor sensibilidade (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). Recentemente, uma técnica de ionização alternativa, fotoionização a pressão atmosférica (FIPA) (atmospheric pressure photo-ionization - APCI) foi introduzida no mercado. TAKINO *et al.* (2004) não observaram adutos de sódio ou

potássio no espectro de massas e o íon mais abundante foi relativo ao $[M+H]^+$. Os autores compararam a linearidade das interfaces ESI e APPI (Atmospheric Pressure Photoionization - fotoionização a pressão atmosférica) para aflatoxinas e notaram que no APPI não foi observado nenhum efeito de matriz significativo. Os dados revelaram que o APPI é uma interface muito mais sensível e seletiva que o ESI para análise de AFLs (SOGSERMSAKUL e RAZZAZI-FAZELI, 2008).

A vantagem do uso da cromatografia líquida de ultrapressão (Ultra-Pressure Liquid Chromatography - UPLC) acoplado ao espectrômetro de massas (EM) (mass spectrometry – MS) tandem está no menor consumo de tempo e solventes. Ventura *et al.* (2006), analisando vários parâmetros na otimização da extração das amostras, observaram que, especialmente para a recuperação de AFLs, o pH do extrato desempenhava papel importante (SOGSERMSAKUL e RAZZAZI-FAZELI, 2008).

O espectro dos produtos iônicos das espécies de aflatoxinas protonadas contém um número de produtos de íons abundantes refletindo quebra de ligações e reações de rearranjo dos sistemas de anéis policíclicos junto com perda de água, monóxido de carbono e dióxido de carbono. Apesar desta fragmentação ser favorável somente para avaliações quantitativas por CLAE/EM/EM e não a métodos quantitativos de simples estágios CLAE/EM pois vai de encontro aos critérios da União Europeia (UE) com relação a confirmação da identificação de substâncias de análise de resíduo (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). As transições mais utilizadas para análise de AFLs no monitoramento múltiplo de reações (Multiple Reaction Monitoring - MRM) são: 315,2→259,2 para AFB₁, 315,2→259,2 para AFB₂, 329,2→243,2 para AFG₁, 331,0→245,2 para AFG₂ (VENTURA *et al.*, 2006; SORENSEN e ELBAEK, 2005).

A comparação direta de CLAE-DFL e CLAE-EM revelaram, na maioria dos casos, boa correlação dos resultados quantitativos, apesar da sensibilidade e robustez do método por CLAE-EM parecer inferior ao CLAE-DFL. Isso pode ser parcialmente explicado pelo uso de instrumentação do quadrupolo simples no modo SIM que é inferior ao triplo quadrupolo e SRM (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

3.3 FUMONISINAS

As fumonisinas, descobertas recentemente em 1988, foram isoladas na África a partir de amostras de milho mofado proveniente de região com elevada incidência de câncer do esôfago (GELDERBLOM *et al.*, 1988). São produzidas principalmente por *Fusarium*

moniliforme, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. nygamai*, *F. subglutinans*, *F. polyhialidicum*, *F. oxysporum* e também pelo gênero *Alternaria* (MARASAS *et al.*, 1988 e CAST, 2003). Existem pelos menos 18 análogos de fumonisinas identificados e classificados de acordo com sua estrutura química em séries A, B, C, F, K e P, sendo a fumonisina B₁ (FB₁) a mais tóxica e mais abundante, compreendendo de 60 a 90% das fumonisinas encontradas em culturas de laboratório e em amostras de milho, seguida por FB₂ e FB₃ (POZZI *et al.*, 2002).

Apesar dos cereais serem importantes como substratos, o nível de umidade e a temperatura e atividade de água são os fatores abióticos críticos que regulam o crescimento dos fungos e a produção de fumonisinas. Níveis de umidade do grão menores que 22% podem reduzir ou prevenir a produção de toxinas durante armazenamento. Estudos demonstraram ainda que o nível de toxina se eleva concomitantemente ao aumento do nível de umidade do grão, em temperaturas de 20 e 25°C. A 30°C, um efeito inverso é notado, um aumento do nível de umidade no grão leva à redução na produção de toxinas. A mais elevada produção de micotoxinas foi obtida em culturas a 25°C. A 20°C, a produção caiu e os índices mais baixos foram observados em culturas a 30°C. A temperatura média ideal para produção de FB₁ foi 24,5°C (±2°C) e para FB₂ foi 24,2°C (±2°C) (EGMONG, 1995).

3.3.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECANISMO DE AÇÃO DAS FUMONISINAS

Fumonisinias estão estruturalmente relacionadas ao grupo dos diésteres de propano-1, 2, 3- ácido tricarbóxico e vários 2-amino-12, 16-dimetilpolihidroieicosanos onde os grupos hidroxilas C14 e C15 estão esterificados com o grupo carbonila dos ácidos do ácido tricarbóxico (BEZUIDENHOUT, 1988). A FB₁ é um diéster de propano 1,2,3-ácido tricarbóxico e 2S-amino -12S, 16R dimetil - 3S, 5R, 10R, 14S, 15R - pentahidroxicosano em que os grupos hidroxilas em C14 e C15 estão esterificados com o grupo carboxila terminal do ácido propano 1, 2, 3 -tricarbóxico. A FB₂ não possui o grupo hidroxila em C10, enquanto que a FB₃ não apresenta o grupo hidroxila em C5. As fumonisinas parcial ou completamente hidrolisadas ocorrem em menor quantidade (LINO *et al.*, 2006). As estruturas químicas das principais fumonisinas estão representadas no Figura 4.

As fumonisinas são moléculas fortemente polares, solúveis em água e em acetoneitrila-água e insolúveis em solventes orgânicos. A hidrólise das fumonisinas através do

aquecimento com ácido hidroclórico 6 M ou hidróxido de potássio 0,05 e 2 M produz ácido tricarbóxico e o aminopoliol correspondente (SCOTT, 1993).

O mecanismo de ação das fumonisinas ainda não é perfeitamente conhecido. Alguns autores propõem que sua ação é caracterizada pela inibição da enzima N-acetiltransferase que leva à redução da biossíntese “de novo” de esfingolípídeo ou “turnover” de esfingosina e conseqüente elevação da razão esfinganina e esfingosina no soro de animais expostos. A molécula de FB₁ tem uma similaridade com o complexo amino álcool esfingosina, que é um dos trinta ou mais aminoalcoois de cadeia longa encontrados nos esfingolípídeos de várias espécies. Os esfingolípídeos mais abundantes dos tecidos animais são a esfingosina e os glicosfingolípídeos (MERRILL *et al.*, 1993, WANG *et al.*, 1991; POZZI *et al.*, 2002).

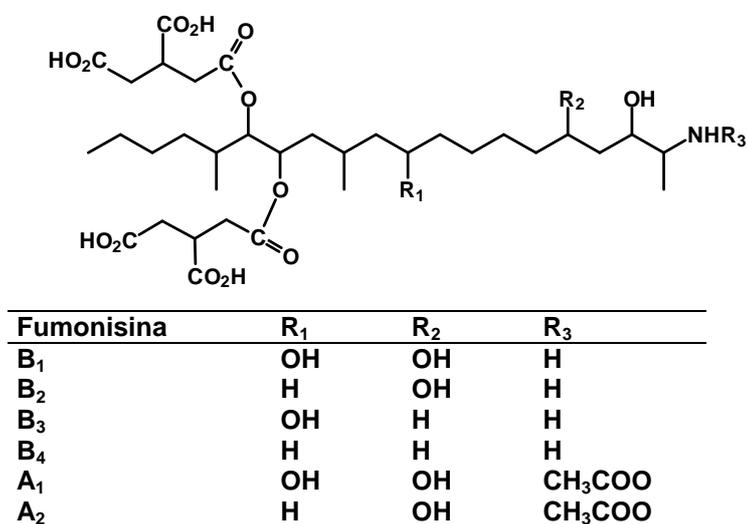


Figura 4: Estrutura química das principais fumonisinas.

A esfingosina é sintetizada no retículo endoplasmático através da combinação de palmitol-CoA e o aminoácido serina, formando o 3-ceto esfingonina que é reduzido à esfinganina e esfingosina. O sítio específico de ação de FB₁ parece ser as enzimas esfinganina e esfingosina N-acetiltransferase. A inibição desta via metabólica resulta na depleção do complexo esfingolípídeo, aumento intracelular de concentração de esfinganina livre (ou em menor grau de esfingosina livre) e um aumento dos produtos de clivagem. O acúmulo das bases esfingoides é a causa primária da toxicidade das fumonisinas (MERRILL *et al.*, 1993, WANG *et al.*, 1991).

A inibição de biossíntese dos esfingolípídeos pode ter um profundo efeito sobre a célula, uma vez que esses componentes têm papel importante na estrutura da membrana, comunicação celular, interação intracelular e matrix celular, regulação de fatores de crescimento, como mensageiro de vários fatores, incluindo fator de necrose de tumor,

interleucina 1 e fator de crescimento de nervos (MERRILL *et al.*, 1993, WANG *et al.*, 1991; POZZI *et al.*, 2002).

A fumonisina B₁ causa leucoencefalomalácia em equinos (LEME), edema pulmonar em suínos, hepatotoxicidade e hepatocarcinogenicidade em ratos e hemorragia cerebral em coelhos. O câncer esofágico em humanos foi associado, provavelmente à presença de fumonisinas na dieta da população na China e África do Sul. Nódulos hiperplásicos no fígado e lesões na mucosa distal do esôfago de suínos recém-desmamados que consumiram ração contaminada com fumonisinas, também foram reportados. As fumonisinas causam a redução do ganho de peso em aves e suínos. A LEME é uma doença não infecciosa esporádica fatal que afeta o sistema nervoso central (SNC) de cavalos e outros equídeos. (HUSSEIN e BRASEL *et al.*, 2001).

3.3.2. MÉTODOS DE ANÁLISE DE FUMONISINAS

Diferentes técnicas analíticas, tais como cromatografia em camada delgada (CCD), ELISA, GC/EM, CLAE e CLAE/EM tem sido usadas para determinação de FBs em alimentos, rações e fluido biológicos (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). Devido à ausência de cromóforo UV em suas moléculas, é necessário uma derivatização pré-coluna. Normalmente é feita uma reação do grupo amino com *o*-fitalaldeído (OPA) e análise por CLAE-DFL, sendo o método mais usado para determinação de fumonisinas em alimentos e ração (SHEPHARD, 1998). Entretanto, o fato dos produtos da reação de derivatização serem pouco estáveis conduz a que a intensidade de fluorescência do derivado OPA-FB₁ decresça rapidamente após a derivatização, o que constitui uma desvantagem (SHEPHARD, 1998). Outros reagentes tem sido usados na derivatização de fumonisinas, sendo o 6-amino-quinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ.Fluor) o que mais oferece vantagens sobre o OPA, pois os derivados são estáveis, pelo menos durante 48 h, permitindo uma boa resposta a nível de fluorescência (VELÁZQUEZ *et al.*, 2000). Na etapa de purificação é utilizada extração em fase sólida (solid phase extraction – SPE) com cartuchos de troca aniônica (strong anion-exchange – SAX), fase reversa (reverse phase – RP) C18 ou CIA (LINO *et al.*, 2006).

Os métodos por CLAE/EM ou CLAE/EM/EM tem sido muito utilizados, pois não necessitam de derivatização e fornecem a confirmação da identidade e elucidção estrutural da molécula. Em geral as fumonisinas não eluem bem em colunas de fase reversa em sistemas de fase móvel neutra e não tamponada, por isso, ácido acético, ácido fórmico ou ácido trifluoroacético (TFA) são usualmente adicionados à fase móvel para aumentar a retenção do

analito e também melhorar a forma do pico e, conseqüentemente a eficiência da separação cromatográfica pela protonação dos grupos carboxilas. Uma redução adicional da calda do pico foi observada quando a coluna recebe um pré-tratamento com EDTA para remover traços de íons metálicos que podem formar complexos estáveis com moléculas de fumonisinas desprotonadas.

Fumonisininas são analisadas com ESI. Moléculas protonadas $[M+H]^+$ ou desprotonadas $[M-H]^-$ são estáveis e abundantes com pouco ou nenhum grau de fragmentação formados nos modos positivos ou negativos. Além disso, a formação de íons moleculares com dupla carga no modo de íon negativo e adutos de sódio e potássio podem ser observados. A formação de adutos no modo positivo parece às vezes uma questão crítica na detecção e sensibilidade (CALDAS *et al.*, 1995) e mais frequentemente usada (SOGSERMSAKUL e RAZZAZI-FAZELI, 2008) onde os picos bases registrados para a determinação quantitativa são m/z 722 como $[M+H]^+$ para FB_1 e m/z 706 como $[M+H]^+$ para FB_2 (JOSEPHS, 1996). Embora as moléculas protonadas $[M+H]^+$ parecem ser três vezes mais abundantes que as moléculas desprotonadas $[M-H]^-$, alguns autores recomendam a aquisição em modo negativo (DOERGE *et al.*, 1994; ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006) onde os íons $[M-H]^-$ analisados são respectivamente m/z 720 e m/z 704 (SOGSERMSAKUL e RAZZAZI-FAZELI, 2008). Para HFB_1 o íon pseudomolecular m/z 406 é observado como pico base, notando-se picos adicionais referentes aos adutos de Na^+ e K^+ (HARTL e HUMPF, 1999).

Geralmente o padrão de fragmentação de todas as FBs são similares. Como exemplo, para FB_1 os íons filhos, m/z 686 e 668 representam perdas consecutivas de moléculas de água, que corresponde ao número de grupos hidroxila do esqueleto da fumonisina. A eliminação de ácido tricarbóxicos (ATC) de ambos os lados da cadeia leva a fragmentação que corresponde a m/z 370 $[M+H-2ATC]^+$ (JOSEPHS, 1996).

3.4 TRICOTECENOS

A principal fonte de contaminação por tricotecenos em alimentos são os cereais (milho, aveia, cevada e trigo) que são infectados por fungos do gênero *Fusarium*. Enquanto os tricotecenos tipo A e B estão igualmente distribuídos nestes produtos, os tipos C e D, apesar de mais tóxicos, ocorrem raramente em alimentos e rações. Assim, as toxinas T-2 e a HT-2, representantes do tipo A, e desoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV), que representam o tipo B, têm recebido maior atenção devido a alta toxicidade e sua prevalência na ocorrência. (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

3.4.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECANISMO DE AÇÃO

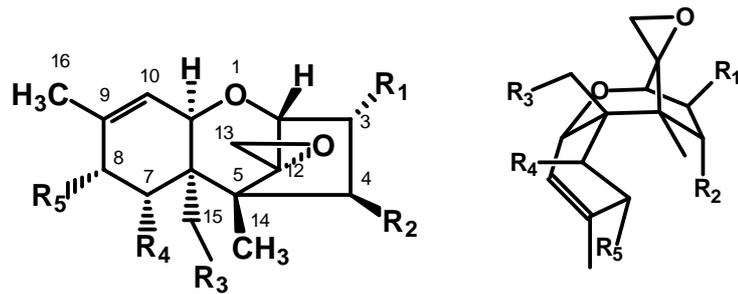
Os tricotecenos são um grupo particular de micotoxinas produzidos por fungos do gênero *Fusarium*. Cerca de 190 estruturas diferentes foram descobertas tendo em comum um sistema tetracíclico de anéis sesquiterpenóides 12,13-epóxitricotec-9-eno. Eles estão divididos em quatro grupos que são distinguidos por uma característica estrutural específica: tipo A, sem o grupo carbonila na posição C-8; tipo B, com o grupo carbonila na posição C-8; tipo C, com um segundo grupo epoxi e o tipo D com uma estrutura macrocíclica, conforme pode ser observado na Figura 5 (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

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

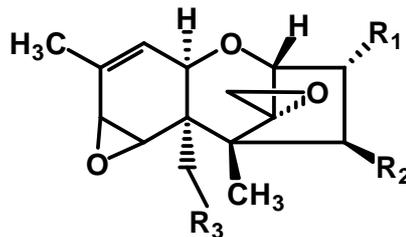
Os tricotecenos são estáveis a 120°C, moderadamente estáveis a 180°C e se decompõem a 210°C após 30-40 min (Joint FAO/WHO, 2001). Os tricotecenos do grupo A são estáveis em metanol em temperatura ambiente, sendo acetonitrila e acetato de etila os solventes mais indicados para sua conservação, pelo menos até 24 meses em temperatura máxima de 25°C. As toxinas DON e NIV, do grupo B, são mais estáveis em acetato de etila (MILANEZ *et al.*, 2003).

Nos tricotecenos, o grupo epóxi da posição 12,13 é bastante estável e sua integridade é provavelmente responsável pelos seus efeitos tóxicos. O anel é bastante estável ao ataque nucleofílico, entretanto, aquecido à ebulição em condição muito ácida e por muito tempo, ocorre rearranjo intramolecular transformando-se em anel apotricoteceno (MILANEZ *et al.*, 2003).

A ação tóxica destas micotoxinas é atribuída a inibição da síntese proteica, através da ligação dos seus grupos epóxidos com grupamentos sulfidrilas dos aminoácidos que compõem a peptidiltransferase acarretando alterações do sistema hematopoético, linfático e imunodepressão (MILANEZ *et al.*, 2003).

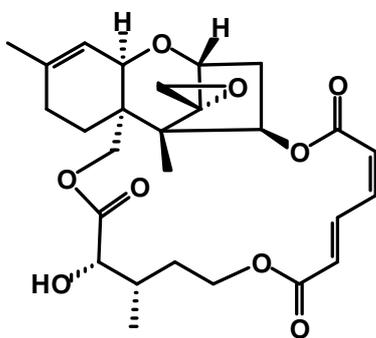


Tricotecenos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Tipo A					
Toxina HT-2 (HT-2)	OH	OH	O-OAc	H	-OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Toxina T-2 (T-2)	OH	O-OAc	O-OAc	H	-OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Diacetoxiscirpenol (DAS)	OH	OH	O-OAc	H	H
Monoacetoxiscirpenol (MAS)	OH	O-OAc	O-OAc	H	H
Neosolaniol (NEO)	OH	O-OAc	O-OAc	H	O-OAc
Verrucarol (VER)	H	OH	OH	H	H
Tipo B					
Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH	=O
Desoxinivalenol (DON)	OH	H	OH	OH	=O
3-AcetilDON (3AcDON)	O-OAc	H	OH	OH	=O
15-AcetilDON (15AcDON)	OH	H	O-OAc	OH	=O
Fusarenona X	OH	O-OAc	OH	OH	=O

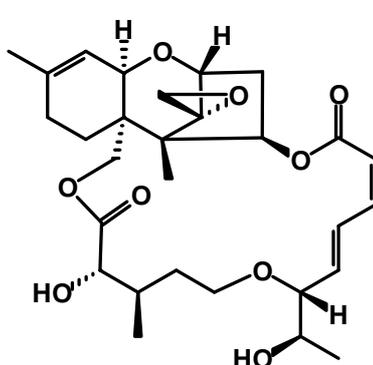


Tricotecenos	R ₁	R ₂	R ₃
Tipo C			
Crotocina	H	H	-OCOCH=CHCH ₃

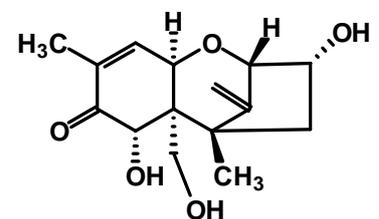
Tricotecenos Tipo D



Verrucarina A



Roridina A



Deepoxi desoxinivalenol

Figura 5: Estrutura química dos principais tricotecenos.

Os tricotecenos iniciam uma gama extensiva de efeitos em homens e animais, como redução no consumo de alimentos, irritação na pele, diarreia, hemorragia múltipla e imunossupressão. Várias doenças tem sido diretamente associadas à intoxicação por tricotecenos, tais como a aleucia tóxica alimentar (ATA) na Rússia em 1913 e 1944 (IARC, 1993; MILANEZ *et al.*, 2006). Devido a sua toxicidade e frequente ocorrência, os países da CE estabeleceram limites legais para DON de 1250 para cereais não processados, 1750 µg/kg para trigo, milho e aveia não processados, 750 µg/kg para cereais para consumo humano direto, 500 µg/kg para pães e biscoitos e 200 µg/kg para alimentos infantis (COMISSÃO REGULADORA Nº 1881/2006).

A ingestão de grãos contaminados é a principal via de exposição aos tricotecenos, tanto em animais como em humanos. Pode afetar diversos grãos como cevada, milho, aveia e centeio. Por ser um componente estável também pode ser detectado em vários produtos processados a base de cereais, incluindo cereais matinais, pão, macarrão, alimentos infantis, malte e cerveja. As toxinas T-2 e DAS (diacetoxiscirpenol) são do ponto de vista toxicológico as mais potentes, mas não aquelas de maior incidência nos grãos. Por sua vez, o desoxinivalenol (DON), também conhecido como vomitoxina, é provavelmente o tricoteceno mais frequente em alimentos e rações. Intoxicação aguda causado pelo DON tem sido observada somente em suínos, tidos como os animais domésticos mais suscetíveis aos efeitos da toxina (MILANEZ *et al.*, 2003).

Tabela 3: Valores de LD₅₀ intraperitoneal de alguns tricotecenos para ratos (Fonte: Adaptado por MILANEZ, 2003).

Tricoteceno	LD ₅₀ (mg/kg peso corpóreo)
Nivalenol	4,1
Desoxinivalenol	70,0
Toxina T-2	5,2
Toxina HT-2	9,0
Diacetoxiscirpenol	23,0

3.4.2.MÉTODOS DE ANÁLISE DE TRICOTECENOS

Os métodos disponíveis para análise de tricotecenos envolvem predominantemente cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) ou com detector de captura de elétrons (CG/DCE) após diferentes procedimentos de purificação e derivatização (LANGSETH e RUNDBERGET, 1998; KRŠKA *et al.*, 2001a). A limitação dos métodos por CG é a necessidade de derivatização, enquanto as principais vantagens destes métodos são a

alta eficiência de separação de misturas, o custo efetivo e o modo relativamente fácil para alcançar resultados seguros para misturas de tricotecenos dos tipos A e B (KRSKA *et al.*, 2001a). Métodos baseados em CLAE sem detector de EM são menos frequentemente aplicados devido a baixa sensibilidade dos detectores UV aos tricotecenos e relativamente baixa eficiência de separação do CLAE em comparação ao CG quando se necessita de análise multitricotecenos (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). Além disso, ensaios tipo ELISA frequentemente usados com propósito de triagem, podem produzir dados quantitativos imprecisos e níveis superestimados de tricotecenos em amostras biológicas (JOSEPHS *et al.*, 2001).

No preparo de amostras para análise de tricotecenos por CLAE/EM, matrizes sólidas, como grãos, são extraídas com soluções de acetonitrila/água em diferentes proporções. O extrato é purificado em coluna MycoSep, ou em colunas de imunoafinidade ou por extração em fase sólida utilizando outros adsorventes, dependendo dos interferentes da matriz biológica utilizada. Alguns autores sugerem que esta etapa de purificação não seja necessária (BISELLI *et al.*, 2004; BISELLI *et al.*, 2005; SORENSEN e ELBAEK, 2005; ROYER *et al.*, 2004; ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). O uso de EM como um detector seletivo oferece considerável vantagem em procedimentos de purificação não seletivos, sendo descritos inclusive a injeção direta de extratos brutos de grãos em sistemas de CLAE-EM/EM (SOGSERMSAKUL e RAZZAZI-FAZELI, 2008).

A ionização no modo negativo tem se mostrado mais sensível para os B-tricotecenos. Em contraste com os A-tricotecenos, onde o modo positivo de ionização forneceu sinais de alta intensidade. Dependendo da estrutura do B-tricoteceno, íons pseudo-moleculares desprotonados $[M-H]^-$ e fragmentos $[M-H-CH_2O]^-$ são observados. Quando tampões de acetato ou formato são adicionados na fase móvel, são observados principalmente os adutos $[M+HCOO]^-$ e $[M+CH_3COO]^-$ (RAZZAZI-FAZELI *et al.*, 2003). Os instrumentos Ion trap parecem não ser tão sensíveis quanto os tandem quadrupolo (SOGSERMSAKUL e RAZZAZI-FAZELI, 2008).

Na CLAE a fase reversa é preferida para fase estacionária, enquanto várias soluções de ACN:H₂O, ACN:MeOH: H₂O, MeOH: H₂O podem ser utilizadas como fase móvel, tanto no modo isocrático quanto no gradiente. Neste contexto, o metanol foi especialmente indicado para aumentar sensibilidade de EM por tricoteceno tipo B quando comparado à acetonitrila. Ácido acético e acetato de amônio são predominantemente aplicados como elementos aditivos

para melhorar a separação cromatográfica ou forçar formação de adutos a fim de melhorar a sensibilidade do EM ou elucidação estrutural (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

As principais dificuldades encontradas nas análises de tricotocenos por CLAE/MS parece ser na coeluição de tricotecenos polares como DON e NIV com interferentes da matriz e na identificação de isômeros como 3- e 15AcDON (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). Com a aplicação de gradiente quaternário esta separação pode ser feita a nível de linha de base assim como de outros 10 tricotecenos. O modo de ionização por eletronspray (ESI) é preferido na maioria de aplicações quantitativas, pois, também parece ser mais robusto e sensível que a ionização química a pressão atmosférica (APCI). Isto se deve pela alta fragmentação na fonte APCI, com degradação de DON no modo positivo (ROYER *et al.*, 2004).

A maioria dos autores não usou um padrão interno para compensar as perdas do analito, efeito matriz ou desvios na performance do detector de EM. Três métodos de CLAE/MS aplicaram padrões internos (reserpina, dexametason e nafcilina), estas substâncias que não possuem nenhuma semelhança físico-química com os tricotecenos. Por conseguinte, só são capazes de compensar variações do dedector (BISELLI *et al.*, 2004; BISELLI *et al.*, 2005; ROYER *et al.*, 2004). Alguns autores utilizam verrucarol, um tricoteceno semi sintético, hidrocortisona e ainda DOM-1 (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

No caso de análise de multitricotocenos, porém, parece duvidoso se um padrão interno estruturalmente semelhante pode compensar suficientemente variados efeitos de componentes da matriz com relação à eficiência de ionização de 9 a 12 analitos eluindo com grande variação de polaridade na uma coluna de CLAE. Em alguns casos, a simples diluição do extrato antes da análise por CLAE- EM poderia resolver estes problemas, apesar de diminuir a sensibilidade do método. De forma interessante, efeitos da matriz podem ser excluídos utilizando isótopos marcados como padrão interno, devido à espectros de massa e propriedades de CLAE semelhantes (RAZZAZI-FAZELI *et al.*, 2002; ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

3.5 ZEARALENONA

A zearalenona (ZON) é uma micotoxina estrogênica não esteroideal produzida por algumas espécies do gênero *Fusarium* como *F. tricinctum*, *F. roseum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* e *F. moniliforme*. Como a maioria dessas espécies fúngicas também são produtoras de outras toxinas como DON e T-2, é muito difícil que apenas a zearalenona seja

encontrada quando essas espécies estão contaminando os grãos (SANTIN *et al.*, 2000). Pode estar presente em milho, amendoim, sorgo, cevada, café, arroz, e outros cereais, podendo sobreviver também em produtos derivados para consumo direto (SCUSSEL, 1998).

Fatores como condições climáticas, espécies de *Fusarium*, cepas predominantes durante o crescimento dos grãos, estágio de maturação e tipos de híbridos plantados podem afetar a produção de suas micotoxinas (LEONI e SOARES, 2003). A melhor temperatura para o crescimento de *Fusarium* spp. é 25°C (DIONELLO *et al.*, 2000), porém a maior produção de zearalenona ocorre com temperaturas entre 12-18°C. (DIONELLO *et al.*, 2000; PRADO *et al.*, 1995). O milho é geralmente invadido por *Fusarium* durante o armazenamento do milho, quando a umidade do grão é superior a 14% possibilita a produção de zearalenona (PRADO *et al.*, 1995; SABINO *et al.*, 1986; FIGUEIRA *et al.*, 2003).

3.5.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECANISMO DE AÇÃO DA ZEARALENONA

A zearalenona, micotoxina produzida por fungos do gênero *Fusarium*, é uma beta-lactona do ácido resorcíclico, biossinteticamente classificado no grupo dos policetídeos como nonacética. Sua estrutura química, bem como a dos seus metabólitos, pode ser observada na Figura 6 (LAWLEY *et al.*, 2008).

A zearalenona (C₁₈H₂₂O₅) é uma substância cristalina branca que apresenta fluorescência azul-esverdeada quando exposta à luz UV de comprimento longo (360µm) e fluorescência verde intensa quando exposta à luz UV de comprimento curto (260µm); possui massa molecular 318 e ponto de fusão 164 - 165°C. Sua solubilidade em água é aproximadamente 0,002g/100ml. É levemente solúvel em hexano, sendo mais solúvel em benzeno, acetonitrila, metanol, etanol e acetona. Também é solúvel em álcali aquoso. As evidências sobre a ocorrência destes metabólitos em alimentos são limitadas. Entretanto há evidências experimentais sobre a transmissão de zearalenona e α- e β-zearalenóis ao leite de cabra, vaca e porcas alimentadas com rações com elevadas concentrações desta micotoxina. (LAWLEY *et al.*, 2008).

O efeito mais importante da zearalenona é no sistema reprodutivo. Estudos em animais demonstraram que esta micotoxina é absorvida de maneira quase sempre rápida por administração oral e pode ser metabolizada pelo tecido intestinal em porcos e, possivelmente também em humanos com a formação α- e β-zearalenóis que são, subsequentemente,

conjugados com ácido glicurônico. A proporção destes vários produtos pode variar consideravelmente entre as espécies. Causa hiperestrogenismo em suínos, abortos, natimortos, falso cio, prolapso retal e da vagina, infertilidade e efeminização dos machos, entre outros efeitos (LAWLEY *et al.*, 2008; MALLMANN, 1989).

Estudos demonstraram que suínos que consumiram ração contendo 50mg/kg de zearalenona pura sofreram aborto e presença de natimortos, enquanto níveis acima de 10mg/kg reduziram o tamanho da ninhada e o peso dos filhotes.

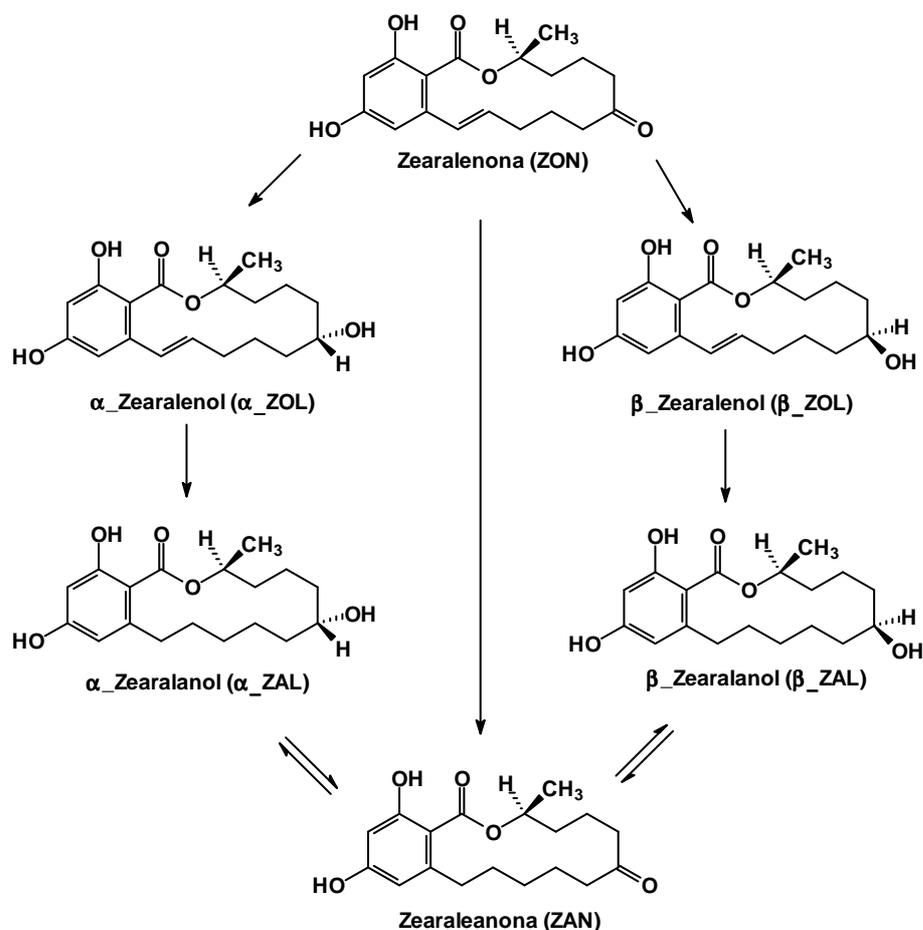


Figura 6: Estrutura química da zearalenona e seus metabólitos.

Análises da alimentação de suínos fêmeas demonstraram que a concentração de 0,25mg/kg ou menos produz vermelhidão e inchaço da vulva, leve inchaço das mamas com numerosos folículos vesiculares e alguns cistos foliculares no ovário. Embora os suínos sejam a espécie doméstica mais sensível à zearalenona, outras espécies animais apresentaram sintomas devido aos efeitos estrogênicos da zearalenona, quando submetidos a esta. Há evidências limitadas, em animais de experimento para o efeito carcinogênico da zearalenona e

tem sido sugerido que esta é genotóxica em ratos. Entretanto, esses efeitos podem ser dependentes da espécie e mais estudos são necessários para confirmar quando a zearalenona pode ser considerada um potente carcinogênico ou mutagênico para humanos. Apesar da associação entre a exposição à zearalenona e doenças humanas permanecer especulativa, esta foi considerada um possível agente causador de surtos de puberdade precoce em milhares de crianças em Porto Rico e tem sido sugerido seu envolvimento no desenvolvimento do câncer cervical humano (MALLMANN, 1989).

3.5.2 MÉTODOS DE ANÁLISE DE ZEARALENONA

Devido aos fortes efeitos estrogênicos da zearalenona e seus metabólitos, a legislação europeia atual estabeleceu níveis de tolerância máxima entre 20 a 350 µg/kg em milho (COMISSÃO REGULADORA N° 1881/2006). Devido a forte fluorescência natural da ZON e seus metabólitos, a combinação de CLAE com detector de fluorescência é atualmente o método preferido que oferece seletividade, sensibilidade e eficiência de separação suficientemente satisfatório, após purificação da amostra (VISCONTI *et al.*, 1998; KRSKA *et al.*, 2001b). A utilização de métodos baseados em CG é limitada devido à demora e necessidade de derivatização dos grupos hidroxila e fenólico, por isso, somente CG/EM é mais aplicado para a confirmação inequívoca de amostras positivas. CCD (MEDINA e SCHWARTZ, 1993) e ELISA (BENNETT *et al.*, 1994) também são frequentemente aplicados para seleção segura de ZON e seus metabólitos.

Geralmente e independente do método de detecção ou da matriz, sofisticados protocolos de purificação e enriquecimento da amostra são, na maioria dos casos, pré-requisitos para alcançar os níveis de sensibilidade pedidos para ZON e seu metabólitos. Com relação a isso, os demorados métodos de extração líquido/líquido propensos a erros são crescentemente substituídos por extração em fase sólida (SPE) com materiais como fase reversa, aminopropil e imunoafinidade ou por colunas de MycoSep que contêm uma mistura de carvão, resinas iônicas e outros materiais (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

Cereais ou grãos sólidos geralmente são extraídos com misturas de acetonitrila:água, tecidos animais com metanol ou com misturas de ácido metafosfórico:acetonitrila e culturas fúngicas com metanol:cloreto de sódio aquoso. Para análise de matrizes graxas, acetato de sódio em metanol:água tem sido usados em combinações com extensas extrações líquido-líquido e CLAE preparativa. Com estes procedimentos α -ZAL e β -ZAL podem ser detectados junto com outros 34 metabólitos no tecido adiposo de rim (JOOS e VANRYCKEGHEM,

1999). Com poucas exceções, análises diretas do extrato cru por CLEA/EM ou extrações líquido-líquido e purificação em CLAE-preparativa, extratos brutos e amostras líquidas são geralmente submetidos a uma ou duas etapas consecutivas de SPE (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

Em geral colunas MycoSep oferecem baixas recuperações para ZON, na faixa de 30-40% com material do tipo 226 e até mesmo não sendo de confiança para análises de ZON pois o analito pode ser completamente perdido devido ao fenômeno de adsorção irreversível em coluna MycoSep 227 (ROYER *et al.*, 2004; ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006), em contraste com Mycosep 224, onde Silva e Vargas (2001) obtiveram 99,4% de recuperação em amostras de milho contaminadas artificialmente. A purificação com coluna de imunoafinidade mostrou ser menos satisfatória em combinação com CLAE/EM, já que sua especificidade está em contradição com a capacidade de detecção multi-analito do EM. Além disso, investigações detalhadas com ZON demonstraram que a combinação da purificação de amostras altamente seletivas e a alta seletividade do detector EM/EM é, em alguns casos, um “assassinato analítico” (ZÖLLNER *et al.*, 1999). É claro que isso depende da própria seletividade do EM. Quando instrumentos de EM quadrupolo simples são usados no modo de SIM, a limpeza total da amostra seletiva poderia ser necessária para remover qualquer interferência da matriz que não é visível com o espectrômetro de massa tandem mais seletivo no modo de SRM (SONGSERMSAKUL *et al.*, 2006).

A princípio a separação cromatográfica para detector EM é de grande importância já que na análise de ZON e seus metabólitos frequentemente aparecem dois ou mais analitos com massas moleculares bem parecidas ou idênticas e o comportamento de fragmentação faz tanto o modo SIM quanto MRM mais difíceis devido à influência mútua de íons traço (van BENNEKOM *et al.*, 2002). Além disso, a gama de matrizes de diferentes amostras em combinação com purificação menos seletiva da amostra conduz, apesar da alta seletividade do EM, a "interferências visíveis da matriz" frente à cromatogramas de CL/EM. Para uma identificação acurada e quantificação, estes componentes da matriz devem ser separados suficientemente, especialmente β -ZAL e β -ZOL. Fases estacionárias como RP-18 e RP-8 são comumente usadas com misturas de metanol:água, acetonitrila:água e metanol:acetonitrila:água como fases móveis tanto no modo isocrático quanto gradiente. Acetato de amônia, ácido fórmico e acético e TFA são frequentemente acrescentados para aumentar a eficiência da separação cromatográfica e/ou eficiência da ionização (KLEINOVA *et al.*, 2002; JODLBAUER *et al.*, 2000; ZÖLLNER *et al.*, 2002). Análise de traços de ZON

de rotina pode ser realizado com ESI e APCI, tanto no modo positivo quanto negativo, porém o modo negativo parece ser mais seletivo devido à formação exclusiva da moléculas desprotonadas $[M-H]^-$. O modo positivo é preferido somente quando também são analisados metabólitos como ZON-glicopiranosídeo, que exibe melhor eficiência de ionização e características de fragmentação na fonte no modo positivo (SCHNEWEIS *et al.*, 2002; ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

Alguns autores utilizam ZAN como padrão interno (JODLBAUER *et al.*, 2000), porém, como este metabólito pode ocorrer em alguns tecidos animais, é recomendado o uso de d_2 -ZAN (MW 322) especialmente para produtos de origem animal. Para quantificações no modo MRM, os íons moleculares desprotonados de ZON (m/z 317), α e β -ZOL e ZAN (m/z 319), α e β -ZAL e d_2 -ZAN (m/z 321) foram selecionados como íons precursores. A quantificação foi baseada nas seguintes transições: m/z 131/175 para ZON, m/z 160/174 para α e β -ZOL, m/z 205/275 para ZAN, m/z 277/303 para α e β -ZAL e m/z 207 para d_2 -ZAN (KLEINOVA *et al.*, 2002).

3.6 OCRATOXINA A

Ocratoxina A (OTA) é a mais tóxica do grupo das 07 ocratoxinas existentes. É produzida por várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, principalmente por *Aspergillus ochraceus*, embora também a produzam *A. alutaceus*, *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. sulphureus*, *Penicillium veridicatum*, *P. cyclopium*, *P. commune*, *P. purpurecens*, *P. palitans*, *P. verrucosum*. A contaminação pela OTA é geralmente um problema de armazenamento inadequado, sendo sintetizada a uma temperatura média de 12 a 37°C por fungos do gênero *Aspergillus* e entre 0 a 31°C por fungos do gênero *Penicillium* (PRADO *et al.*, 1995; SCUSSEL, 1998).

Os cereais são as principais fontes de ocratoxina A na dieta humana sendo o trigo, o milho e a cevada os mais susceptíveis, podendo ser encontrada também no café, feijão, nozes, café, frutas secas, sucos de frutas e vinhos (LEATHERHEAD FOOD RESEARCH ASSOCIATION, 2008; PRADO *et al.*, 1995; SCUSSEL, 1998).

A FAO (Food and Agriculture Organization)/ WHO (World Health Organization) e o JECFA (Joint FAO/WHO, 2001) estabeleceram uma quantidade provisória semanal tolerável (PTWI – Provisional Tolerable Weekly Intake) de 100 ng/kg de toxina que causou efeitos adversos em rins suínos. Foi estimada uma baixa quantidade diária tolerável de 4,2 ng/kg/peso corpóreo/dia para seres humanos (SANTOS e VARGAS, 2002).

A Comunidade Europeia (EC) proíbe a venda de gêneros alimentícios com excesso de contaminantes conforme o ponto de vista da saúde pública, e em particular do nível toxicológico. Na Europa, o Comitê Científico para Alimentos da Comunidade Europeia, considerou a ocratoxina um contaminante e agente nefrotóxico. No caso de produtos de café, estados membros da EC como o Reino Unido e a Alemanha estão tentando avaliar a presença de OTA, enquanto que outros estados já introduziram limites nacionais em café verde (Itália, 8 µg/kg; Finlândia, 10 µg/kg; Grécia, 20 µg/kg) ou produtos do café (Suíça, 5 µg/kg). Segundo CALDAS et al. (2002), a Ocratoxina A tem sido relatada em até 50% das amostras de milho, trigo, arroz e feijão analisados em vários estados do Brasil. Apesar da legislação brasileira não prever níveis máximos dessa micotoxina em alimentos, são necessários programas de monitoramento para subsidiar estudos de exposição humana e avaliar a necessidade de estabelecer esses níveis.

3.6.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECANISMO DE AÇÃO

As ocratoxinas são derivadas de diidrometilisocumarina ligada a L-fenilalanina. Existem em várias formas com toxicidade variada, baseada nas constantes de dissociação do grupo hidroxifenólico. A ocratoxina A (OTA) $C_{20}H_{18}ClNO_6$ com peso molecular de 403,82 g/mol, é uma substância cristalina incolor e seu nome químico é cristal L-fenilalanina *N*-[5-cloro-3,4-diidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H 2-benzopirano-7-il] carbonil-(*R*)-isocoumarina. O espectro de UV varia com pH e solventes polares, apresenta absorção máxima em 213 nm e 332 nm em metanol ($\epsilon = 36.800$ e 6.400 , respectivamente). O sinal máximo de emissão no espectro de fluorescência pode ser observado em 428 nm (Leatherhead Food Research Association, 2008).

A ocratoxina A é classificada pela International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993) como substância do grupo 2B devido sua carcinogenicidade. Animais em estudos mostraram que a OTA é uma potente nefrotoxina, imunossupressora e teratogênica. A alteração da filtração glomerular e prejuízos na função dos túbulos contornados proximais são os principais prejuízos da intoxicação por ocratoxina A, levando à perda da capacidade de concentração urinária. A ocratoxicose em suínos traduz-se por uma intoxicação que cursa com diminuição do ganho de peso, sinais clínicos caracterizados por polidipsia e poliúria, além de lesões renais. Doses de 200 µg/kg de OTA na ração foram suficientes para que os animais apresentassem nefropatias, levando a reflexos negativos sobre a conversão alimentar e o ganho de peso. A mortalidade pode chegar 90% nos lotes afetados (DILKIN, 2002). Atua

essencialmente nos túbulos proximais inibindo a fosfoenolpiruvato descarboxilase. Induz a peroxidação de lipídeos, que altera as capacidades estruturais e funcionais afetando o metabolismo do cálcio; inibe as funções plaquetárias; bloqueia a síntese proteica bacteriana, ao competir com a fenilalanina na fenilalanina – tRNA – sintetase; e forma metabólitos de ocratoxina que se ligam ao DNA, causando sua quebra, entre outros efeitos (KROGH *et al.*, 1979).

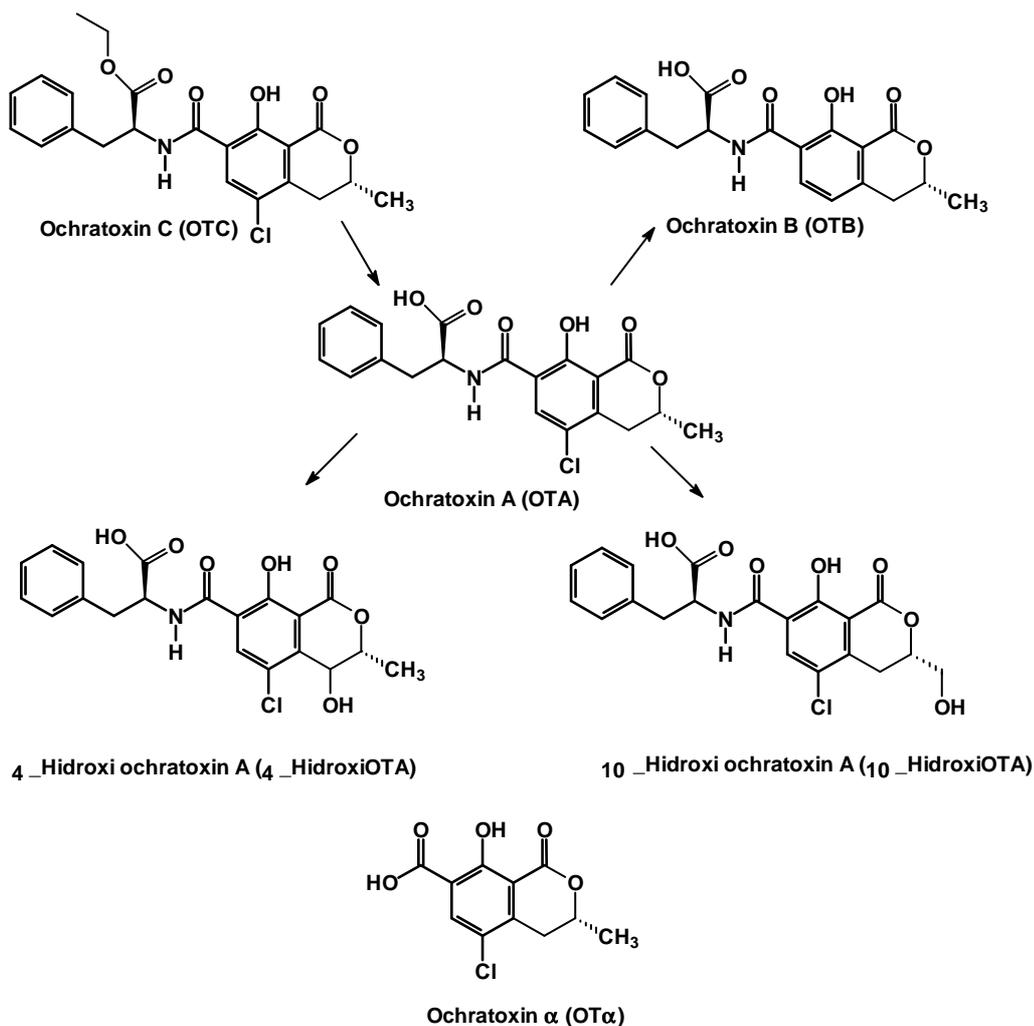


Figura 7: Estrutura química das principais ocratoxinas.

Após sua ingestão, é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, indo para o sangue, onde se liga à albumina. É então distribuída em concentrações tecidulares decrescentes para os pulmões, rim, coração, intestino e testículos. Concentrações menores ocorrem no músculo, baço e cérebro. A maior parte da toxina é excretada na urina. O ciclo enterohepático e uma ligação forte à albumina estão associados ao prolongado tempo de meia-vida da ocratoxina A (PFOHL-LESZKOWICK e MANDERVILLE, 2007).

A nefrotoxicidade é a característica principal desta micotoxina, principalmente em suínos, sendo também hepatotóxica, imunossupressora, carcinogênica e teratogênica. Nefropatias relatadas na Argélia e Tunísia têm sido correlacionadas com a presença desta toxina nos fluidos corpóreos e na comida consumida pela população. A OTA está envolvida na etiologia da Nefropatia Endêmica Balcã (PFOHL-LESZKOWICK e MANDERVILLE, 2007).

A toxicidade crônica favorece a aglutinação das hemácias em nível hepático, o que leva à morte; causa má coordenação motora e paralisia; produz eritemas e petéquias na pele e diminui a sensibilidade cutânea. No fígado, observa-se necrose hepática centroglobular e ligeira a moderada degeneração gorda. Afeta o metabolismo dos carboidratos, promovendo o acúmulo de glicogênio e interferindo com a gluconeogênese (PFOHL-LESZKOWICK e MANDERVILLE, 2007).

3.6.2. MÉTODOS DE ANÁLISE DE OCRATOXINA

Devido a forte fluorescência natural da OTA, CLAE-DFL é preferido nas análises de rotina para OTA, OTB, OTC e seus metabólitos, já que oferece uma melhor seletividade e especificidade comparada a outros detectores. Às vezes, amostras positivas são confirmadas por metilação em uma segunda corrida por CLAE (VALENTA, 1998). Devido a sua robustez, facilidade na técnica e custo, a cromatografia em camada delgada (CCD) com detecção por fluorescência ainda é usada como rotina em países fora da Europa e América do Norte. As principais desvantagens desta técnica são a baixa sensibilidade para OTA (faixa de ppb) e a ocorrência frequente de interferentes da matriz (BETINA, 1993). Métodos baseados em CG recebem menos atenção devido ao erro e o consumo de tempo requerido com a derivatização (metilação) necessária para a volatilidade suficiente do analito. Entretanto, CG/EM deve ser usado para confirmação de amostras positivas (VALENTA, 1998). Os ensaios de ELISA têm se mostrado extremamente satisfatórios para análises rápidas varrendo grande número de amostras. Eles oferecem sensibilidade para OTA comparável ao DFL. Entretanto, devido à reações cruzadas com componentes da matriz, a confirmação por outras técnicas é muito desejável para prevenir resultado falso positivo ou dados quantitativos imprecisos e superestimados (VALENTA, 1998; ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

Em geral, independente da técnica de detecção aplicada, existe a necessidade de purificação e enriquecimento do analito por partição líquido-líquido ou por SPE com materiais adsorventes como RP, sílica ou imunoafinidade (VALENTA, 1998; ZÖLLNER e

MAYER-HELM, 2006). Usualmente amostras sólidas são extraídas com água, acetato de etila, clorofórmio e misturas de metanol:água, acetonitrila:água, acetonitrila:hexano e diclorometano:etanol contendo aditivos com carbonato de sódio e hidrogênio, ácido fórfórico ou cloreto de magnésio para aumentar a solubilidade e eficiência de extração da OTA (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). O ester metílico [D₃] de OTA pode ser facilmente obtido por metilação da OTA com [D₄]-metanol sendo uma opção para um padrão interno marcado (LINDENMEIER *et al.*, 2004). A fase estacionária utilizada na cromatografia antes da detecção por EM é exclusivamente fase-reversa (RP-18 e RP-8) com misturas de metanol:água, acetonitrila:água e metanol:acetonitrila:água como fases móveis, tanto em gradiente como isocrático. O tempo de corrida varia de 10 a 35 minutos dependendo se o foco da análise é somente OTA ou seus metabólitos (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

Em geral e independente da geometria da interface e polaridade de ionização, a OTA oferece um extenso padrão de fragmentação em interfaces APCI resultando em mais baixa sensibilidade comparado a ESI (LAU *et al.* 2000; BECKER *et al.*, 1998). A OTA produz abundantes adutos na fonte de electrospray quando íons de sódio ou potássio estão presentes na fase móvel, sendo citado inclusive a formação de adutos de acetonitrila de OTA no modo de íon negativo (LAU *et al.* 2000; BECKER *et al.*, 1998). Além disso, os usuários de EM simples informaram um rendimento suficiente de produtos na fonte de ESI possibilitando a confirmação estrutural ou elucidação de ocratoxinas e substâncias estruturalmente relacionadas (ZEPNIK *et al.*, 2003; VENTURA *et al.*, 2003). A abundância destes produtos, enquanto refletindo perda de água, ácido fórmico e dióxido de carbono ou divisão típica da ligação amida, pode ser ampliado mais adiante ajustando parâmetros do EM, como a voltagem do cone. A esse respeito, conjugados de ocratoxina podem ser identificados facilmente pela perda na fonte do seus núcleos de carboidrato, glutatona e ácido glicurônico (ZEPNIK *et al.*, 2003; ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

Quando o modo iônico positivo é selecionado são observados o íon pseudo-molecular em abundância [M+H]⁺ a m/z 404 e o aduto de sódio [M+Na]⁺ a m/z 426, além do sinal a m/z 406 referente ao sinal de ¹⁷Cl-OTA. No modo EM/EM foram registrados fragmentos iônicos de m/z 239 referentes à perda da fenilalanina [M+H-Phe]⁺, seguido de m/z 258[M+H-H₂O-CO]⁺ e m/z 286 [M+H-H₂O]⁺ (BECKER *et al.*, 1998; LAU *et al.*, 2000). Já Sorensen *et al.* (2005) analisaram OTA em leite usando ESI no modo negativo observando as transições m/z 402→358 e m/z 402→167 a partir do íon [M-H]⁻. O limite de detecção encontrado usando-se CLAE-MS íon trap foi comparável com o obtido por CLAE-DFL

combinado com CIA tendo a possibilidade adicional da confirmação não ambígua de OTA apesar de, em muitos casos, o uso de CIA ser indispensável para eliminar o efeito da matriz (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

Experimentos para quantificação de OTA por MRM geralmente são feitos em modo positivo obtendo-se como íon o produto específico da clivagem do grupamento amida m/z 239 (BECKER *et al.*, 1998; LINDENMEIER *et al.*, 2004; ZÖLLNER *et al.*, 2000b), devido ao padrão de fragmentação não específico no modo negativo e alta energia de colisão necessária para obtenção deste fragmento. Os padrões internos mais frequentes usados para a análise de OTA são [D₅] OTA, OTB e ZAN, sendo os dois últimos adicionados após limpeza em CIA para avaliar possíveis efeitos da matriz (LINDENMEIER *et al.*, 2004).

3.7 ALCALOIDES DE ERGOT

Uma das mais antigas micotoxicoses em humanos é o ergotismo, que é causada por alcaloides tóxicos produzidos por diferentes espécies de fungos tais como *Claviceps*, *Neotyphodium* e *Epichloe* ssp. O ergotismo foi mencionado pela primeira vez na Mesopotâmia em 600AC pelos Assírios. Entretanto, foi na Idade Média que tomou maior proporção ficando conhecida como “fogo-de-santo-antônio”, consta que milhares de pessoas morreram desta epidemia. Aqueles acometidos por tal praga, sofreram sérios problemas neurológicos, incluindo fortes ataques epiléticos e terríveis alucinações após o consumo de pão contaminado (CAST, 2003; SOGSERMSAKUL e RAZZAZI-FAZELI, 2008).

O principal agente causador desta praga foi um fungo denominado ergot (*Claviceps purpurea*), um contaminante comum no centeio e em outros cereais. Entretanto *Claviceps africanum*, *Claviceps sorghi* e *Neotyphodium coenophialum* também são descritos como produtores (SOGSERMSAKUL e RAZZAZI-FAZELI, 2008). Estes fungos biossintetizam uma classe de metabólitos secundários conhecidos como alcaloides do ergot, que exercem atividades no sistema nervoso central e atuam como vasoconstritores. A ergometrina, um dos alcaloides da família do ergot, foi aquele que revelou possuir maior atividade vasoconstritora. Investigações posteriores transformaram um perigoso agente da medicina popular em um fármaco clinicamente útil, já que a ergometrina é a droga de escolha para o tratamento de hemorragias pós-parto. Pesquisas envolvendo os componentes ativos do ergot, levaram o cientista suíço Hoffman, em 1943, à descoberta de uma das substâncias químicas mais notáveis, o LSD (dietilamina do ácido lisérgico) (KROGH, 2001).

O ciclo evolutivo de *C. purpurea* no ambiente tem sido bem documentado (LACEY 1991). Após infecção das plantas pelo fungo, as hifas fúngicas substituem as do tecido da planta, principalmente as espigas, que tem coloração violeta escura e é chamado de “ergot” (esporão em francês) ou “sclerotium”. A esclerotia de cada espécie contém difere no espectro de alcaloides. Além disso, o conteúdo de vários alcaloides diferem também com o crescimento de *C. purpurea* em diferentes produtos agrícolas (KROGH, 2001).

3.7.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECANISMO DE AÇÃO DOS ALCALOIDES DE ERGOT

Os alcaloides de ergot fazem parte dos alcaloides indólicos tendo vários efeitos biológicos e farmacêuticos. Existem cerca de 80 ou mais alcaloides de ergot e muitos deles são suspeitos de serem psicoativos. Os alcaloides de ergot consistem em sistemas de anéis tetracíclicos ergolina do ácido lisérgico como sua estrutura básica (Figura 8). Os principais alcaloides de ergot são divididos em três grupos: tipo clavina, tipo amida de derivados do ácido lisérgico (solúveis em água) tais como ergometrina, e os peptídios derivados do ácido lisérgico ou ergopeptídios (insolúveis em água) tais como ergotamina, ergovalina, ergosina, ergocornine, ergocriptina e ergocristina. Os alcaloides tipo clavina, tais como agroclavina, é um potente estimulante uterino e a ergovalina é o principal alcaloide produzido em algumas gramíneas infectadas. Os principais alcaloides produzidos por *Claviceps* ssp. são ergometrina, ergotamina, ergosina, ergocornina e ergocristina (SOGSERMSAKUL e RAZZAZI-FAZELI, 2008).

O envenenamento em humanos ou animais causa efeitos convulsivos e gangrena. Náuseas e vômitos também são relatados. A ação vasoconstritora do grupo das ergotaminas leva a efeito gangrenoso. Toxicoses em porcos e gado são descritos como associados a desordem reprodutiva e inibição da secreção de prolactina em porcas prenhas e, em muitos casos, a aborto. Ergotismo mostrou alta mortalidade acima de 34% e 5-10 g de ergot fresco pode ser letal ao homem (CAST, 2003).

Em bovinos, a intoxicação por ergoalcaloides produzidos por *Claviceps purpurea* pode ter quatro apresentações clínicas: síndrome distérmica (SD); gangrena seca das extremidades; forma convulsiva e (4) abortos (ILHA *et al.*, 2001). A SD tende a ocorrer em estações com temperaturas elevadas, enquanto a forma gangrenosa tipicamente ocorre em temperaturas ambientais mais baixas (BURFENING, 1973). Assim, a ocorrência simultânea dessas duas formas, em condições espontâneas, é rara. A SD (também denominada hipertermia) está

associada à ingestão de alcaloides do ergot presentes em sementes de plantas infectadas com os escleródios do fungo *C. purpurea* (ILHA *et al.*, 2001). Essa toxicose tem sido também observada associada ao consumo da gramínea *Festuca* sp contaminada pelo fungo endofítico *Neotyphodium* (Acremonium) *coenophialum* que também produz ergocalcoides (PATERSON *et al.* 1995). Em bovinos há também redução na produção de leite (ILHA *et al.*, 2001).

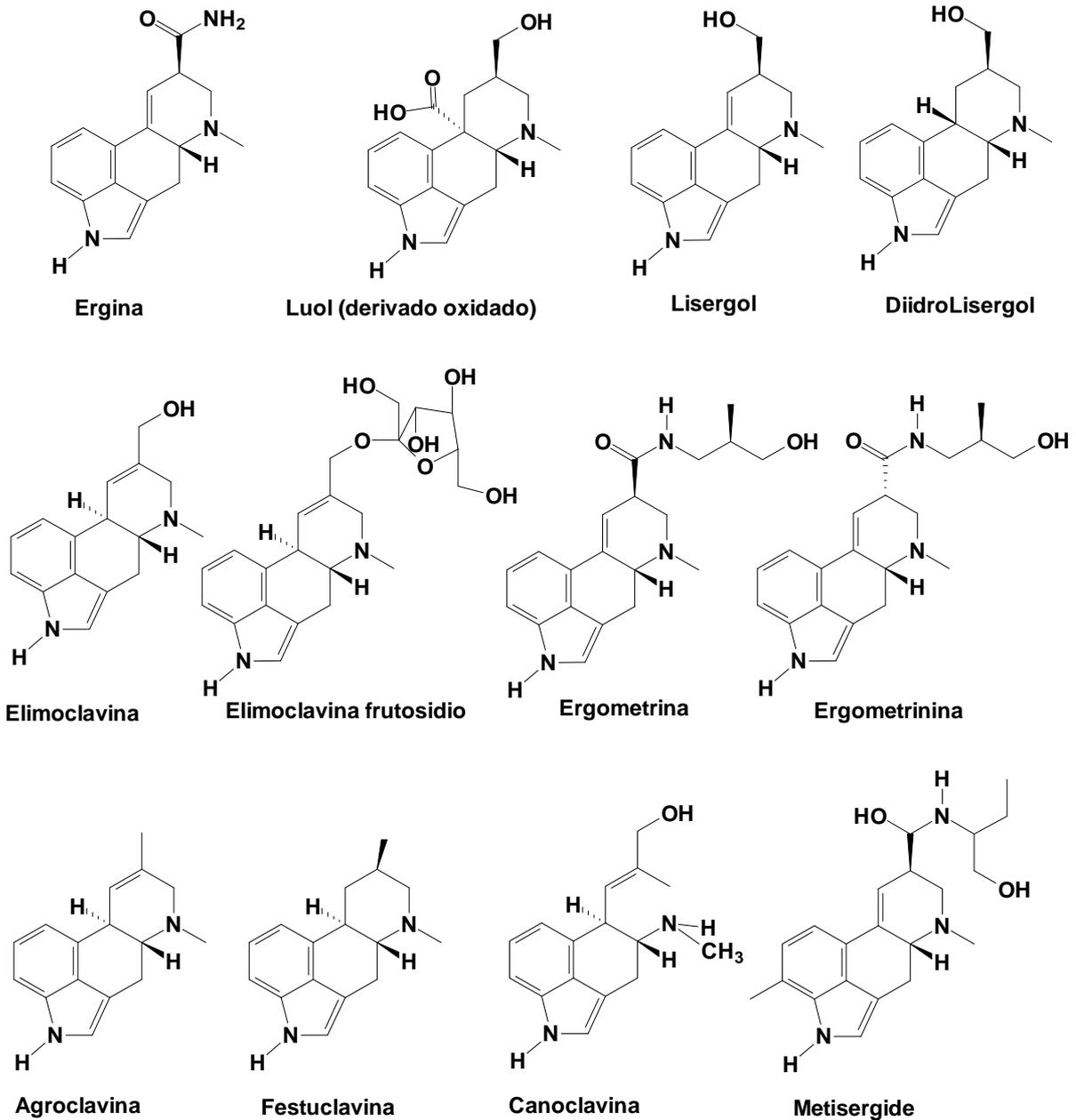


Figura 8: Estrutura química dos principais alcaloides de Ergot.

O nível máximo em grãos nos EUA e no Canadá é de 300 mg de ergot/kg. Na CE foram estabelecidos os níveis máximos de 500 mg de ergot/kg de ergot em grãos para consumo humano e 1.000 mg/kg em grãos para ração animal (COMISSÃO REGULADORA Nº 1881/2006). O peso total de ergots (sclerotia) em grãos parece ser medido gravimetricamente, mas este método não informa sobre a quantidade de alcaloides de ergot, que pode ser totalmente diferente dos ergots (SOGSERMSAKUL e RAZZAZI-FAZELI, 2008).

3.7.2. MÉTODOS DE ANÁLISE DOS ALCALOIDES DE ERGOT

Vários métodos, tais como CCD, CG, EC) e CLAE-DFL, são utilizados para a análise de alcaloides de ergot. A CLAE-DFL demonstrou sensibilidade, precisão e reprodutibilidade apropriados e podem ser usados na rotina de laboratórios para análise de alcaloides de ergot; entretanto os procedimentos de preparo da amostra são laboriosos e demorados. Utilizando CLAE-DFL, alguns alcaloides de ergot (ergotamina, ergosina, ergocorinina, ergocriptina e ergocristina) podem ser quantificados até 4 ng/g em alimentos após purificação em SPE C₁₈. Um teste ELISA com foco em ergovalina como substância indicadora também foi desenvolvido. Para muitos alcaloides existem padrões disponíveis; a espectrometria de massas é uma ferramenta usada para identificar picos desconhecidos no cromatograma. A CLAE-EM/EM e CLAE-EM com interface eletrospray no modo positivo de ionização são usados para verificação, confirmação e elucidação estrutural dos principais alcaloides de ergot (SHELBY *et al.*, 1997). Principalmente íons pseudomoleculares [M+H]⁺ ou adutos de sódio [M+Na]⁺ e potássio [M+K]⁺ são registrados. No caso de ergotpeptídios, a perda de uma ou duas moléculas de água, assim como outros fragmentos de lisergamida protonados (m/z 268); sistema sergolina ABCD 9,10 insaturada (m/z 223) são registrados. No caso de ergovalinae ergotamina, o fragmento m/z 320 devido à clivagem do anel peptídico (funções amida e éter) é registrado. Para ergocorinini, ergocriptina e ergocristina, o fragmento m/z 348 é registrado devido à clivagem e perda do sistema do anel peptídico (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006). Em contraste, estes tipos de fragmentação não são observados na amida ergonovina derivado do ácido lisérgico, indicando a confiança de interpretações posteriores. Por outro lado, no espectro de alcaloides de ergot tipo clavina (ácido lisérgico e lisergol) os fragmentos m/z 268, 251 e 225 estão ausentes (LEHNER *et al.*, 2005). A quantificação de vários alcaloides simultaneamente é descrito também por Uhlig *et al.* (2006) e Sulyok *et al.* (2007a).

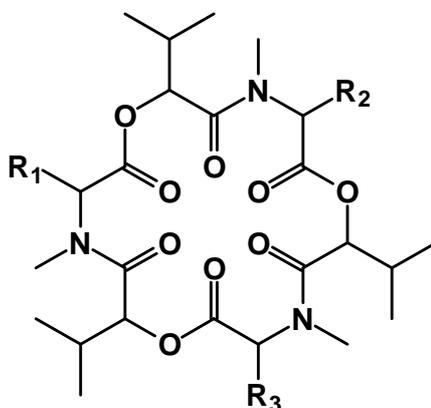
3.8 OUTRAS MICOTOXINAS

Embora existam muitas outras micotoxinas, nem todas oferecem um risco potencial quanto às discutidas anteriormente devido a sua baixa toxicidade ou incidência. Muitas delas aparecem em alimentos já deteriorados e, por isso, muitas vezes sua análise é mais relevante em produtos processados. A seguir são descritas as características e a análise de algumas destas micotoxinas que estão incluídas no método multianalito utilizado nesta tese.

3.8.1. HEXADEPSIPEPTÍDIOS CÍCLICOS

As eniatinas (EA) e substâncias estruturalmente relacionadas as bovericinas (BEA) são produzidas por diferentes espécies de *Fusarium* em grãos. Embora eles não estejam associados à micotoxicoses agudas, vários estudos toxicológicos mostraram claramente que eles são citotóxicos, tem propriedades inseticidas e podem induzir apoptoses e fragmentação de ADN em células de mamíferos (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

As eniatinas possuem uma estrutura de hexadepsipeptídeo cíclico diferindo na substituição do N-metilamino ácida como pode ser observado na Figura 9. Não há relatos da ocorrência desta classe de micotoxinas no Brasil (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).



Bovericina	$R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$
Eniatina A	$R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$
Eniatina A1	$R_1 = R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ e $R_3 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Eniatina B	$R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Eniatina B1	$R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ e $R_2 = R_3 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Figura 9: Estrutura química dos hexadepsipeptídeos cíclicos.

Usualmente, BEA e EA são analisadas por CLAE-UV com um limite de detecção de 50 µg/kg em milho a um comprimento de onda de 192nm (KRSKA *et al.*, 1996). Métodos baseados em CLAE-EM oferecem consideravelmente menor tempo no preparo de amostra e

evita também outras limitações de detectores não seletivos como UV. Extratos metanólicos, em acetonitrila: água e com flúidos supercríticos, principalmente de amostras de grãos, são injetados diretamente no sistema cromatográfico CLAE-EM ou purificados com uma única etapa adicional em RP-SPE. Em geral, separações cromatográficas de misturas de BEA e EAs podem ser facilmente feitas em colunas RP-18 em 10-15min. com misturas de acetonitrila/água ou metanol/água em gradiente ou misturas isocráticas de acetonitrila/metanol/solução aquosa de formiato de amônia (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

O modo negativo é 100 vezes menos sensível que no modo positivo (UHLIG e IVANOVA, 2004). Espectros dos produtos iônicos de colisão ativada de EAs indicam quebras das ligações amida e perdas de uma ou duas unidades de monômeros seguida por eliminação de água e monóxido de carbono (UHLIG e IVANOVA, 2004; JESTOI *et al.*, 2005). As mudanças de unidades de monômeros e dímeros são geralmente usadas como produtos iônicos para detecção por MRM. Somente um método por CLAE-EM/EM, descrito por Jestoi *et al.* (2005), está de acordo com os critérios a UE (EU Commission Decision 2002/657/EC e EU Commission Decision 2002/67/EC) para a detecção indubitável de análise de resíduos e oferece os limites de detecção para todos os analitos bem abaixo do nível de ppb (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

3.8.2. MONILIFORMINA

A moniliformina (MON) é formada em cereais por numerosas espécies de *Fusarium*, incluindo *F. avenaceum*, *F. subglutinans*, and *F. proliferatum* e ocorre como sal de potássio ou de sódio de 1-hidroxíciclobut-1-ene-3,4-diona (Figura 10). Estes fungos comumente produzem também outras micotoxinas importantes de forma que moniliformina está frequentemente presente em uma mistura de micotoxinas. Esta micotoxina não recebe muita atenção porque não parece ser carcinogênica e são necessárias quantidades relativamente altas para causar efeitos toxicológicos significantes. Estes foram demonstrados em um número limitado de espécies animais. Sua estabilidade e destino durante processamento também são pouco estudados de forma que o grau de exposição do consumidor é incerto (LAWLEY, 2008).

A moniliformina é uma substância iônica formada por sais de sódio e potássio, logo, é solúvel em água e solventes polares, forma cristais amarelos claros. A literatura informa os valores de pKa entre 0,0 e 1,7. Com aquecimento, a moniliformina como ácido livre se

decompõe a 150-153°C sem derreter. A absorção máxima no UV são 229 nm e 260 nm em metanol (LAWLEY, 2008).

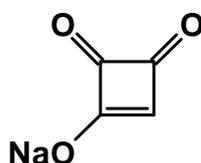


Figura 10: Estrutura química da moniliformina (MON).

Há uma quantidade limitada de dados referente aos efeitos de moniliformina em mamífero. A LD₅₀ oral em roedores é aproximadamente 25-50 mg/kg e para frangos de 4 mg/kg. O LD₅₀ foi de 21 e 29 mg/kg para ratos fêmeas e machos, respectivamente. Em estudos de doses agudas, a lesão principal parece ser hemorragia intestinal, mas em estudos com doses sub-agudas e crônicas em uma variedade de espécies de aves e roedores de laboratório, o alvo principal foi o coração. É um inibidor potente do piruvato mitocondrial e oxidação de cetogluturato (LAWLEY, 2008).

Dados dos efeitos da moniliformina na reprodução e em fetos e seu potencial mutagênico e carcinogênico foram negativos, mas extremamente limitados. Em alguns estudos foi achado que moniliformina causou aberrações cromosomais. É citotóxica para células de mamífero em concentrações mais altas. Em estudos nos quais pintinhos foram alimentados com dietas contendo 50 mg/kg de moniliformina, as aves consumiram mais alimento, mas pesaram menos. Em humanos, a moniliformina foi associada casualmente com infecção de Keshan, endêmico em certas áreas de China (LAWLEY, 2008).

Dados sobre a ocorrência de moniliformina em alimentos é escasso. Concentrações de até 12 mg/kg ocorreram em milho para consumo humano. Mais recentemente, análise de produtos de milho moído importados, destinados para incorporação em matéria-primas de alimento de animal no Reino Unido, mostrou 60% de amostras contaminadas com concentrações de até 4,6 mg/kg de moniliformina. A moniliformina foi encontrada também em amostras de outros cereais inclusive aveia, trigo, centeio, triticale e arroz (LAWLEY, 2008).

3.8.3 PATULINA

A patulina (PAT) é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochylamys*, que podem crescer em vários alimentos, sendo o produtor mais importante o *Penicillium expansum* (CAST, 2003). Sua estrutura química é 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2-(6H)-ona; é uma lactona heterocíclica insaturada com estrutura apresentada na Figura 11. Foi identificada em maçãs podres contaminadas por fungos e em cidra comercial (sweet apple cider) em níveis até 45 mg/L. A patulina também foi identificada em numerosas outras frutas, legumes, cereais e rações animais mofadas; é estável em maçã e sucos de uva e em milho seco. Em quase todos casos, porém, a contaminação de patulina foi restrita a alimentos mofados ou podres. A patulina é um sólido cristalino incolor, com um ponto de fusão de 110°C. A absorção máxima no UV é a 276 nm (ϵ 14.450). O espectro de massas mostra os íons proeminentes m/z 154 (M^+), 136, 126, 110, 97, 82, 71, 69, 55 e 53. (Leatherhead Food Research Association, 2008).

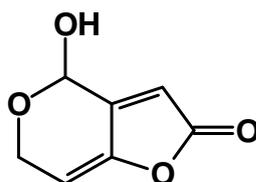


Figura 11: Estrutura química da patulina (PAT).

A patulina é considerada mutagênica, imunossupressora e neurotóxica, embora não seja carcinogênica. O limite máximo de patulina estabelecido na CE é de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em sucos de maçã e de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em produtos de maçã e sucos destinado a crianças (COMISSÃO REGULADORA N° 1881/2006).

A extração líquido-líquido e SPE são os métodos tradicionais de purificação de amostra na análise de patulina em alimentos antes da análise por CCD, CLAE, CG-EM, CLAE-EM. Recentemente, foi desenvolvido um teste por imunofluorescência (109). A análise por CLAE com detector de UV permite análise traço de patulina devido à forte absorção desta substância no UV a 275nm. A análise de patulina por CLAE-EM é realizada utilizando principalmente o modo negativo de ionização gerando íons pseudomoleculares desprotonados (m/z 153 $[M-H]^-$) tanto por ESI quanto APCI. Os fragmentos observados são devido a perdas sucessivas de água (m/z 135), monóxido de carbono (m/z 125), e dióxido de carbono ou acetaldeído (m/z 109). A sensibilidade e repetitividade dos métodos por CLAE-EM não são

tão boas quanto os métodos convencionais por CLAE-UV (ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006).

3.8.4. CITRININA

A citrinina (CTN) foi isolada pela primeira vez como substância pura de uma cultura de *Penicillium citrinum* em 1931. Posteriormente, foi encontrada em arroz amarelado contaminado com *P. citrinum* importado da Tailândia para o Japão em 1951, e investigações subsequentes mostraram que os fungos isolados produziram citrinina (Leatherhead Food Research Association, 2008).

Desde então, várias outras espécies de *Penicillium*, incluindo *P. Verrucosum*, foram descritas como produtoras de citrinina. Porque este fungo é o principal produtor de OTA em cereais como trigo e cevada, não é surpreendente que ambas as micotoxinas ocorram juntas, embora citrinina seja frequentemente menos relatada (Leatherhead Food Research Association, 2008).

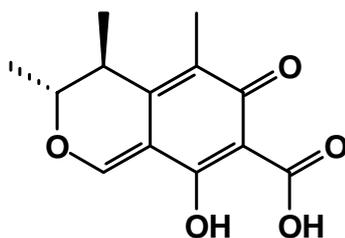


Figura 12: Estrutura química da citrinina (CTN) (<http://www.answers.com/topic/citrinin>).

Porém, isto pode não refletir a situação real, pois, como a citrinina não é investigada frequentemente, e quando é encontrada pode ser parcialmente perdida durante alguns procedimentos analíticos. Outros fungos citados como produtores de citrinina incluem *Aspergillus terreus*, *A. carneus* e *A. niveus*. Estudos recentes sugerem que a citrinina parece ter potencial como poderoso agente antibactericida, mas seu efeito em rins de mamífero descartou rapidamente esta possibilidade (Leatherhead Food Research Association, 2008).

A citrinina é uma substância de baixo peso molecular, cristaliza como cristais incolores que fundem a 172°C, é parcialmente solúvel em água mas solúvel em soluções diluídas de hidróxido de sódio, carbonato de sódio ou acetato de sódio, em metanol, acetonitrila, etanol e outros solventes orgânicos polares. Pode ocorrer fotodecomposição em luz fluorescente em solução e no estado sólido. Pode ser degradado em ácido, solução

alcalina, ou através de calor. Reações de coloração incluem marrom com cloreto férrico, verde com cloreto de titânio e profundamente vinho-vermelho com peróxido de hidrogênio seguido por álcali (Leatherhead Food Research Association, 2008).

A LD₅₀ da citrinina foi descrita como aproximadamente 50 mg/kg por administração oral para o rato 35-58 mg/kg para camundongo e 19 mg/kg para coelho. A citrinina causa dano nos rins e dano moderado no fígado na forma de infiltração gordurosa. Outros efeitos incluem vasodilatação, constrição dos brônquios e aumento no tônus muscular (Leatherhead Food Research Association, 2008).

Como frequentemente existe a coocorrência com OTA, foi associada à nefropatia de porcos na Dinamarca, Suécia, Noruega e Irlanda e a nefropatia de aves. Doses realmente letais administradas em coelhos, porcos da guiné, ratos, camundongos ou porcos causam inchaço dos rins com eventual necrose. Em camundongos, a citrinina é embriocida e fetotóxica enquanto em ratos induz efeitos semelhantes e doses altas são teratogênicas. Há somente evidências limitadas para a carcinogenicidade da citrinina em animais experimentais (Leatherhead Food Research Association, 2008).

Parece muito pouco provável que a citrinina apresente risco a saúde humana em circunstâncias normais, pois é instável em cereais processados, de forma que provavelmente o maior risco é para o gado e, particularmente, porcos, alimentados com produtos a base de cereais contaminados (Leatherhead Food Research Association, 2008).

A citrinina foi encontrada principalmente em arroz, trigo, farinha, cevada, milho, centeio, aveia, amendoim e frutas e pode coocorrer em cereais com OTA (Leatherhead Food Research Association, 2008).

3.8.5 TOXINAS DE *ALTERNARIA*

Alternaria é um gênero comum com várias espécies que pode invadir produtos antes ou depois da colheita e estocagem e causa perdas consideráveis devido ao apodrecimento de frutas e legumes. Em condições favoráveis, pode produzir uma gama de micotoxinas como também outros metabólitos menos tóxicos. Algumas espécies são bastante particulares a vegetais específicos. *A. alternata* é provavelmente a espécie produtora de micotoxina mais importante e ocorre em cereais, semente de girassol, oleaginosas, azeitonas, várias frutas, etc. Um grande número de metabólitos foi relatado de forma que a situação é semelhante às micotoxinas de *Fusarium* pois, atualmente, só se tem conhecimento de alguns que ocorrem

naturalmente em alimentos ou tem significado toxicológico relevante. As principais micotoxinas de *Alternaria* que ocorrem naturalmente são ácido de tenuazonico, alternariol monometil éter (AME), alternariol, altenueno e altertoxina I. Isoaltenueno e altertoxina II não foram encontrados em alimentos de colheita. AAL-toxinas são produzidas por *A. alternata* f. sp. *Lycopersici*, um tipo raro de *A. alternata*, e são estruturalmente relacionados a fumonisinas. Há só um relato da ocorrência natural delas em silagem de feno. (LAWLEY, 2008).

O ácido tenuazônico é um óleo viscoso incolor e é um ácido de monobásico com pKa 3,5, solúvel em metanol e clorofórmio. A atividade óptica é perdida quando aquecido ou tratado com uma base, a cristalização pode acontecer como resultado da formação de ácido isotenuazônico. Forma complexos com íons de cálcio, magnésio, cobre, ferro e níquel. O ácido de tenuazônico normalmente é armazenado como seu sal de cobre. Alternariol e alternariolmonometiléter cristalizam em etanol como agulhas incolores, e com pontos de fusão e de decomposição de 350°C e 267°C, respectivamente. Eles sublimam em alto vácuo sem decompor a 250°C e 180-200°C. Eles são solúveis na maioria dos solventes orgânicos e dão uma reação de cor roxa com cloreto férrico em etanol. Altenueno cristaliza como prismas incolores que fundem a 190-191°C. Altertoxina I é um sólido amorfo funde a 180°C e tem fluorescência amarela luminosa sob luz UV (LAWLEY, 2008).

Toxinas de *Alternaria* exibem efeitos agudos e crônicos. A LD₅₀ para alternariolmonometiléter, alternariol, altenueno, e altertoxina I em ratos foram avaliadas como 400, 400, 50 e 200 mg/kg/p.c. respectivamente, enquanto para ácido tenuazonico são 162 e 115 mg/kg/p.c. para ratos macho e fêmeas, respectivamente (LAWLEY, 2008).

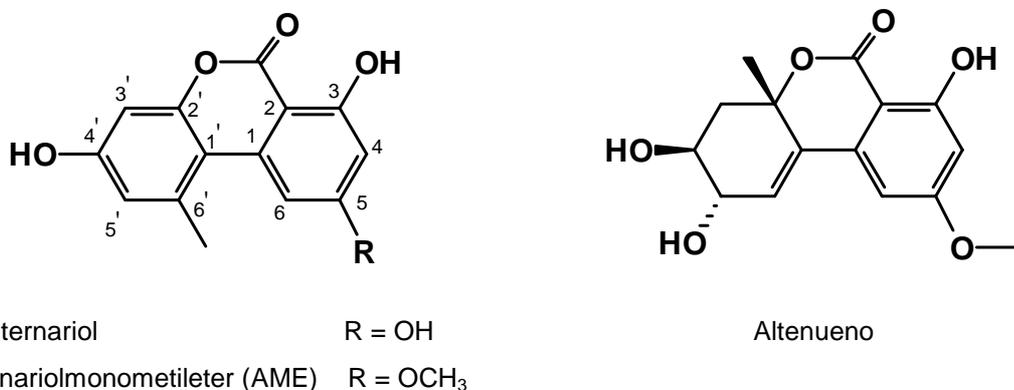


Figura 13: Estrutura química das toxinas de *Alternaria*.

O ácido tenuazônico foi mais estudado. Seu principal modo de ação parece ser a inibição da síntese de proteína por supressão da liberação de proteínas recentemente formadas nos ribossomas para fluido citoplasmático. Exibe atividade antitumoral, antiviral e antibacteriana. Alternariol e AME mostraram efeitos teratogênico em ratos, inclusive apresentando efeito sinérgico quando uma combinação das toxinas foi administrada. A maioria das micotoxinas de *Alternaria* exibe atividade citotóxica considerável e as altertoxinas são de uma preocupação particular devido à sua atividade mutagênica. Altertoxin III exibe atividade mutagênica que é aproximadamente um décimo da atividade da aflatoxina B1, enquanto altertoxinas I e II mostraram menor mutagenicidade (LAWLEY, 2008).

A contaminação com alternariol, AME, ácido de tenuazônico, e, em alguns casos, altenueno e altertoxina I, normalmente está associada com frutas, legumes e sementes oleaginosas visivelmente infetadas por *Alternaria*, inclusive tomates, azeitonas, pimentas, e maçãs. Ocorrência de *Alternaria* spp. e suas micotoxinas em sementes oleaginosas, cereais como sorgo, trigo, centeio, arroz doente e tabaco é relatada em vários trabalhos (LAWLEY, 2008).

3.9. O MILHO NO BRASIL

O milho é uma monocotiledônea de distribuição mundial pertencente à família das gramíneas (*Poaceae*), tribo *Maydeae*, gênero *Zea*, cientificamente denominado de *Zea mays* L.. Classificado entre cereais de extrema importância na alimentação humana e animal, apresenta alta eficiência na produção de alimentos com qualidade nutricional, justificando a sua introdução como ingrediente nos mais diversos produtos derivados. A domesticação do milho ocorreu entre 5.000 a 10.000 anos no México, provavelmente no Vale de Oaxaca (Estado de Oaxaca) e Vale de Balsas (Estados de Michoacán e Guerrero), seguindo-se para Tehuacán (Estado de Puebla) e Estado de Tamaulipas, atingindo o sudoeste dos Estados Unidos. Posteriormente difundiu-se para toda a América, permitindo expansão para outros continentes. Atualmente, o milho é uma cultura mundial com produção anual de 583 milhões de toneladas, onde o Brasil participa com 7% do total e tem no Estado do Paraná, a parcela de 29% da safra. As propriedades nutritivas do milho o elegeram como constituinte principal de ração animal com 60% da sua composição e como base alimentar em diversos países (FIGUEIRA et al., 2003).

O milho é insumo para produção de uma centena de produtos, porém na cadeia produtiva de suínos e aves são consumidos aproximadamente 70% do milho produzido no

mundo e entre 70 e 80% do milho produzido no Brasil. O milho corresponde à cerca de 65% da composição das rações avícolas e o farelo de soja é a principal fonte de proteínas (MAYORGA et al., 2008).

Não obstante, este fator torna-o também o alvo vulnerável de deterioração, com destaque a *Fusarium verticillioides* Nirenberg (*F. moniliforme* Sheldon), que além de predominar na fitopatologia do milho, produz micotoxinas representadas principalmente pela fumonisina (FB). Esta toxina é produzida no estágio de préarmazenagem, não sendo degradada pelo processamento industrial (FIGUEIRA et al., 2003).

A deterioração fúngica no estágio de pré-colheita/armazenagem produz perigos potenciais ocultos de micotoxinas aliados às perdas no rendimento agrícola, qualidade sanitária e valor nutricional, estendendo o prejuízo econômico no percurso de toda cadeia alimentar. Salienta-se a importância de micotoxinas entre barreiras fitossanitárias imprescindíveis na comercialização de produtos agrícolas no mundo globalizado. O requerimento perante água divide os fungos presentes nos grãos em dois grupos ecológicos, denominados de fungos de campo e armazenagem. Os grupos de fungos de campo invadem os grãos no estágio de pré-colheita, ou nas espigas pós-colheita antes de debulhamento. Este grupo requer alto teor de umidade (20-21%) e inclui os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*. Os grupos de fungos de armazenagem requerem teor de umidade na faixa de 16% para a invasão micelial e compreendem as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Determinados fungos desenvolvem-se nos grãos imaturo ou maduro, desde que seja próximo ao período de pós-colheita ou armazenagem, constituindo assim, o terceiro grupo denominado de intermediário, onde compreende os gêneros *Epicoccum*, *Nigrospora* e *Papularia*. Segundo Hill, Wilson e McMillian (1985), esta classificação é inadequada nos trópicos úmidos, já que *Aspergillus* e *Penicillium* também podem se desenvolver no campo e produzir micotoxinas no estágio de pré-colheita. As propriedades intrínsecas do milho associam-se a fatores biológicos de ataques fitopatogênicos e/ ou de deterioração, com destaque especial a fungos micotoxigênicos. Salienta-se que *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. solani*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Colletotricum graminicola*, *Helminthosporium maydis*, *Stenocarpella maydis*, *S. macrospora*, *Diplodia* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Nigrospora* spp., *Trichoderma* spp. e *Acremonium* spp. constituem os fungos mais frequentes na microbiota do milho (FIGUEIRA et al., 2003).

3.9.1. OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM MILHO NO BRASIL

A presença de aflatoxinas em alimentos tem sido reportada no mundo todo, principalmente em milho, nozes, amendoim, frutas secas, temperos, figo, óleos vegetais, cacau, arroz e algodão. O Brasil, por ter um clima quente e úmido apresenta as condições ideais para o desenvolvimento de fungos, por conseguinte contaminação por micotoxinas. Segundo a legislação brasileira, o limite máximo permitido de aflatoxinas totais (B1+B2+G1+G2) em milho e amendoim inteiro, amassado, triturado ou farinha de milho destinado ao consumo humano direto ou para fabricação de produtos é de 20µg/kg (BRASIL, 1988, 1996, 2002). O milho degerminado, farelo de milho e germe desengordurado de milho destinado à fabricação de produtos para consumo animal têm como limite máximo permitido pela legislação 50 µg/kg (Resolução 34/1976). Já para AFM1 os limites são de 0,5 µg/kg para leite fluido e de 5 µg/kg para leite em pó (OLIVEIRA e GERMANO, 1997; BAGGIO, 2006).

Em um levantamento sobre pesquisa de micotoxinas no Brasil, abrangendo o período de dez anos (1991-2000), RODRIGUEZ-AMAYA e SABINO (2002) observaram que trinta por cento dos artigos publicados investigaram a ocorrência de micotoxinas em alimentos e em ração. A alta incidência de contaminação com aflatoxinas (AFs) encontrada em produtos como amendoim e derivados é ainda é um problema nacional relevante. Na maioria dos casos mais de 10% das amostras estavam contaminadas com média variando entre 94 a 420 µg/kg. A ocorrência de AFs em milho foi baixa, ocorrendo somente ocasionalmente e com a maior média de contaminação atingindo nível de 75 µg/kg.

Segundo SALAY e MERCADANTE (2002), a incidência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho cultivado no estado de São Paulo e Rio de Janeiro foi menor que a encontrada em estados do nordeste e sul. Enquanto no Ceará 33% das amostras contaminadas atingindo o nível máximo de 130 µg/kg e nos estados do sul 33% a 77% das amostras contaminadas atingindo o nível máximo de 7400 µg/kg; em São Paulo apenas 11% das amostras contaminadas atingindo o nível máximo de 1600 µg/kg.

Como a maior parte da produção de milho em grão no País é destinada à produção de ração, principalmente para aves, é limitada a importância direta dessa contaminação para a saúde humana. Porém existe a possibilidade de transmissão de resíduos tóxicos para a carne, o leite e os ovos, que pode resultar num potente risco à saúde humana. O fígado é o órgão mais suscetível a aflatoxinas, concordando com o fato de que elas são sabidamente hepatocarcinogênicas (CALDAS *et al.*, 2002).

3. 9.2. OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS EM MILHO NO BRASIL

A primeira descrição sobre a ocorrência natural de FB foi realizada por SYDENHAM *et al.* (1990) a partir de milho mofado colhido de uma área em Transkei, Sul da África, que apresentava alta incidência de câncer de esôfago em humanos. Os níveis detectados nas amostras variavam de 44 a 83µg/g. O milho proveniente de algumas regiões da África, com histórico da doença, apresentou altos níveis de contaminação chegando a 117µg/g (ppm), segundo análises realizadas por THIEL *et al.* (1992) (POZZI *et al.*, 2002).

A ocorrência de fumonisinas é dispersa e bem documentada em todo mundo. Embora as fumonisinas sejam encontradas principalmente em milho e seus produtos derivados, a ocorrência natural esporádica de fumonisinas em sorgo, arroz e feijão (navy beans) também é relatada (POZZI *et al.*, 2002).

Alguns casos de intoxicação animal foram relatados no Brasil, como a ocorrência de leucoencefalomalácia em equinos e contaminação por FB₁ e FB₂ em milho estocado em silos nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais e Paraná (MEIRELLES *et al.*, 1991; HIROOKA *et al.* 1991; YAMAGUCHI *et al.*, 1992; HIROOKA *et al.*, 1996).

No Brasil, Yamagushi *et al.* (1992) analisaram 39 lotes de milho colhidos na safra de 1990 e 1991, provenientes de quatro regiões produtoras no Estado do Paraná. A análise de fumonisinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi positiva em 97,4% das amostras para FB₁ e 4,8% para FB₂. As concentrações das micotoxinas detectadas no milho variaram, conforme a região, de 0,6 a 12,6 µg/g para FB₁ e 0,0 a 10,4µg/g para FB₂. Hirooka *et al.* (1996) analisaram 48 amostras de milho no Estado do Paraná e nove no Mato Grosso do Sul e Goiás, colhidas entre 1990 e 1991. Os pesquisadores detectaram fumonisinas em todas as amostras colhidas no Paraná, com níveis que variavam, de acordo com a região, de 3,25 a 4,79µg/g de FB₁ e 2,34 a 3,45µg/g para FB₂. Com exceção de uma amostra proveniente do Estado de Goiás, as outras provenientes da região Central do Brasil também estavam contaminadas com FB₁ e FB₂ (5,45 e 5,0µg/g, respectivamente). Já no Rio Grande do Sul, Mallmann *et al.* (1997) analisaram 169 amostras de alimentos entre os anos de 1996 e 1997 e verificaram a contaminação por fumonisinas em 47,1% das amostras de milho, com concentração média de 8,4µg/g (POZZI *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Orsi *et al.* (2000) mostraram a ocorrência natural de fumonisinas em 195 amostras de híbridos de milho no Estado de São Paulo, sendo 90,2%

delas positivas para FB₁ e 97,4% para FB₂. Os índices médios de contaminação foram de 9,72µg/g de FB₁ e 7,67µg/g de FB₂. Diferenças regionais na concentração de fumonisina foram encontradas quando o mesmo milho híbrido foi analisado no Estado do Paraná, indicando interferências climáticas na predominância de linhagens toxigênicas de *Fusarium* (POZZI *et al.*, 2002).

Apesar dos efeitos tóxicos em humanos serem ainda pouco conhecidos, um estudo sobre a exposição crônica de FB₁ e FB₂ na dieta a partir do consumo de produtos derivados de milho no Brasil mostrou que, devido à alta incidência destas toxinas assim como os altos níveis de exposição da população avaliada, há uma necessidade urgente de serem estabelecidos limites máximos em legislação para controle destas micotoxinas (CALDAS e SILVA, 2007). A CE estabeleceu limites máximos permitidos do total de fumonisinas (FB₁+FB₂) de 2000 µg/g para milho não processado, 1000 µg/g para farinha, germe e óleo refinado, 400 µg/g para outros produtos derivados de milho para consumo humano direto e 200 µg/g para alimentos infantis (COMISSÃO REGULADORA N° 1881/2006).

O processamento do milho por cozimento, fritura ou extrusão a altas temperatura (>190°C) pode reduzir a concentração de fumonisinas nos alimentos (HUMPF e VOSS, 2004). A FB₁ é transformada em seus análogos N-carboximetil quando é aquecido na presença de açúcares redutores (HOWARD *et al.*, 1998).

3. 9.3. OCORRÊNCIA DE TRICOTECENOS EM MILHO NO BRASIL

No Brasil, poucos são os trabalhos que relatam a presença dessas toxinas em grãos para consumo humano. Sabino *et al.* (1989) não detectaram o DON em 46 amostras de milho em grão procedentes de alguns estados brasileiros e em 16 originárias dos Estados Unidos. Em trigo, de 70 amostras, apenas duas amostras estavam contaminadas com 183 ng/g de DON. Furlong *et al.* (1995b) observaram que em 20 amostras de trigo pós-colheita, originárias de São Paulo (Brasil), quatro estavam com DON (470-590 ng/g) e duas com toxina T-2 (400-800 ng/g). Em outro levantamento, o DON foi encontrado em uma amostra de trigo brasileiro (400 ng/g), coletado em silos do Rio Grande do Sul. A toxina T-2 foi detectada em duas amostras (350 e 360 ng/g), em trigo importado e armazenado em silos daquele estado (1995). Pozzi *et al.* (1995) analisaram no período de maio de 1991 a maio de 1992, 130 amostras de milho pós-colheita e armazenado (10 e 120 amostras, respectivamente), originárias de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil), DON não foi detectado em nenhuma das amostras (MILANEZ *et al.*, 2006).

Trabalhos realizados com milho em grão procedente de alguns estados do Brasil (Paraná, Santa Catarina, Goiás e Mato Grosso), da Argentina e Paraguai, safra 1994/1995 demonstraram que somente 05 das 80 amostras provenientes do Estado do Paraná estavam contaminadas com a micotoxina em níveis variáveis entre 125 e 542 ng/g (PRADO *et al.*, 1997).

Milanez *et al.* (2006) encontraram uma entre seis amostras de milho contaminado com toxinas HT2 e T2 nas concentrações de 555 e 767 ng/g, respectivamente; NIV e DON foram detectados em somente uma amostra de fubá pré-cozido entre as 11 amostras analisadas em valores baixo de LOD (166 ng/g para NIV e 167 ng/g para DON) e DAS não foi detectada em nenhuma amostra.

O Brasil ainda não possui nenhuma legislação para tricotecenos em alimentos e rações. O fato dos tricotecenos, e em especial o desoxinivalenol não ser destruído durante o processamento usado para preparar produtos de milho para consumo humano e a alta prevalência de espécies de *Fusarium* em milho do Brasil, devem ser motivos para a regulamentação dos níveis de tolerância para esta micotoxina em cereais e rações pelos órgãos governamentais competentes. (PRADO *et al.*, 1997, MILANEZ *et al.*, 2003).

3.9.4. OCORRÊNCIA DE ZEARALENONA EM MILHO NO BRASIL

No Brasil, a situação da contaminação do milho por zearalenona é a mesma que há dez anos atrás. A baixa incidência desta micotoxina em amostras de milho pode ser pela carência de gêneros produtores específicos e cepas toxigênicas e por fatores climáticos desfavoráveis (JÚNIOR *et al.*, 2001).

A regulamentação para zearalenona é efetiva em cinco países com limites regulados variando de 30 a 1000µg/kg. Atualmente, nenhum limite para zearalenona foi ainda regularizado e estabelecido no Brasil (SABINO *et al.*, 1986).

3.9.5. OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A EM MILHO NO BRASIL

A incidência de ocratoxina A foi baixa nas pesquisas realizadas nos últimos 10 anos com milho brasileiro (RODRIGUEZ-AMAYA e SABINO, 2002).

A baixa incidência de ocratoxina A nas amostras de milho possivelmente indica uma carência de cepas toxigênicas ou condições climáticas desfavoráveis. As amostras

contaminadas com ocratoxina A mostraram que esta toxina pode ser produzida no campo, não sendo somente um problema de armazenamento (JUNIOR *et al.*, 2001).

No Brasil não há legislação vigente sobre os índices de contaminação de ocratoxina A em alimentos destinados ao consumo humano e animal. Na Comunidade Europeia, os índices máximos permitidos para ocratoxina A em cereais crus é de 5µg/kg e em produtos a base de cereais destinados ao consumo humano direto é de 3µg/kg (COMISSÃO REGULADORA Nº 1881/2006).

3.10 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

3.10.1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS:

O espectrômetro de massas (EM) é um instrumento que permite determinar a massa molar de compostos eletricamente carregados, ou íons, previamente formados. Estes íons são selecionados no espectrômetro de massas de acordo com a razão massa-carga (m/z). Em termos dimensionais, a unidade resultante da medida determinada pelo espectrômetro m/z de um íon segue a seguinte convenção: massa (m) em Daltons (Da), definida como 1,0 Da igual a 1/12 da massa de um átomo do isótopo de carbono 12 (^{12}C) sobre o número z que é carga fundamental unitária de um íon. Na maioria dos casos os íons determinados por espectrometria de massas possuem somente uma carga ($z=1$), sendo assim o valor é numericamente igual à massa molecular em Da (ABI, 2005).

A espectrometria de massas é utilizada como uma ferramenta analítica para identificação de compostos, quantificação, elucidação e informação estrutural, que conferem as propriedades químicas da molécula.

O EM possui os seguintes componentes: introdução da amostra (em estado gasoso, líquido ou sólido), por exemplo, um cromatógrafo líquido; uma fonte de ionização (formação de íons na fase gasosa); um ou mais analisadores de massas que separam os íons formados de acordo com a m/z , um detector que “conta” os íons e transforma em corrente elétrica, onde a magnitude do sinal elétrico em função da m/z é convertida por um processador de dados proporcionando um espectro de massas correspondente. Em geral, os analisadores de massas encontram-se sob vácuo, facilitando a transmissão e detecção dos íons, como também diminuindo a fragmentação ocasionada pela presença de moléculas do ar e da água (ABI, 2005).

Desde sua descoberta pelos pesquisadores J.J. Thomson e F.W. Aston, no final do século 19, até os dias atuais os equipamentos empregados na EM sofreram grandes modificações no que se refere ao desenvolvimento tecnológico e suas aplicações (ABI, 2005).

A formação dos íons na fase gasosa é a primeira etapa fundamental para posterior separação e detecção dos íons no EM. Nos primeiros espectrômetros fabricados, as amostras deveriam estar necessariamente em estado gasoso, mas com o desenvolvimento de novas tecnologias, as amostras podem ser introduzidas em soluções na forma sólida, líquida ou gasosa. Dependendo da forma de introdução da amostra, uma determinada técnica de ionização é aplicada e onde os analitos podem estar em solução na forma iônica ou serem ionizados em conjunto com a sua volatilização, ou por outros métodos proporcionados na fonte iônica (ABI, 2005).

A técnica de CLAE/EM compreende a cromatografia líquida para introdução da amostra e espectrometria de massas como detecção e quantificação, geralmente um analisador de massas do tipo quadrupolo. A técnica de ionização utilizada nos instrumentos de CLAE-EM é a ionização a pressão atmosférica (Atmospheric Pressure Chemical Ionization API). Existe também a técnica de CLAE-EM/EM que compreende a técnica de cromatografia líquida acoplada a um detector com dois filtros de massas, geralmente do tipo triplo quadrupolo sequencial (tandem). Atualmente, a técnica de CLAE-EM/EM também pode ser classificada como híbrida, através do analisador/filtro de massas (Q1), uma célula de colisão (Q2), e o terceiro analisador/filtro de massas (Q3) que também possui a função *trap*. Estes sistemas são conhecidos como *traps* lineares. Outros instrumentos de espectrometria de massa possuem analisadores de massa com características de separação distintas, para ganho de exatidão, sensibilidade e/ou resolução (ABI, 2005).

A EM é uma técnica analítica utilizada para identificação de substâncias desconhecidas, elucidação estrutural, propriedades químicas da molécula e quantificação de compostos conhecidos. Para tais respostas, o EM pode nos fornecer as seguintes informações: massas com alta exatidão que podem ser utilizadas para comparação com fórmulas moleculares empíricas; “impressão digital” do produto de fragmentação de uma substância para caracterização da mesma em banco de dados, confirmando sua identidade; fragmentação controlada (variando a energia) da molécula (através de EM/EM ou EMⁿ) para elucidação estrutural de novas substâncias; experimentos de fragmentação com a identificação de íons específicos que podem fornecer informações quanto aos grupos funcionais; abundância relativa de isótopos usados para decifrar a composição elementar dos compostos; quantificar

baixas quantidades (na ordem de 10^{-12} g ou 10^{-15} moles) de substâncias em uma mistura complexa, utilizando a seletividade dos analisadores de massas (modo SIM ou MRM) e as técnicas analíticas de Cromatografia Líquida (CLAE) ou Cromatografia Gasosa (CG). A técnica de EM/EM é geralmente aplicada em sistemas de triplo quadrupolo, o que lhe confere alta seletividade, pois a seleção do íon precursor no primeiro quadrupolo (Q1), a fragmentação na célula de colisão (Q2) e o produto ou fragmento específico selecionado em Q3, permitem monitorar o sinal do composto (precursor-fragmento) a ser quantificado. Este modo é conhecido como Monitoramento de Reação Única (MRU), Monitoramento Seletivo de Reação (Selected reaction monitoring - SMR) ou Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), onde uma ou mais substâncias são monitoradas seletivamente de acordo com as transições selecionadas, ou seja, e selecionado um fragmento gerado por um íon precursor específico. Além disso, podem ser quantificadas várias transições simultaneamente e assim distinguir substâncias que coeluem em uma corrida cromatográfica, se o íon precursor ou fragmento gerado forem diferentes em m/z (ABI, 2005).

O acoplamento do detector EM/EM à técnica de Cromatografia Líquida permite que as substâncias previamente pré-separadas sejam identificadas e quantificadas com alto grau de seletividade, sensibilidade e confiabilidade. Com isso, as substâncias presentes em amostras complexas (ex: fluidos biológicos e alimentos) podem ser analisadas livre de interferentes, proporcionando análises rápidas, sendo os métodos de purificação das amostras mais simples, consumindo menos tempo de preparo e reagentes. Outra vantagem da cromatografia líquida é que as colunas e métodos aplicados, principalmente a fase reversa, resolvem 90% dos casos da separação de substâncias orgânicas e os solventes utilizados nesta, como metanol, acetonitrila e água, são compatíveis e, em alguns casos, imprescindíveis para a formação dos íons nas fontes de API.

Considerando que o EM do tipo tandem EM/EM é um filtro de massas de alta especificidade e que o sinal de uma substância é monitorado através do par precursor/fragmento, pode-se detectar inúmeras substâncias em uma única corrida cromatográfica, em tempo curto e sem interferência, pois as substâncias não necessitam ser separadas em alta resolução cromatográfica diferente da detecção universal característica do detector de ultravioleta/visível (ABI, 2005).

As bombas de CLAE também podem ser utilizadas como meio de transporte de amostras em Análises de Injeção de Fluxo (AIF – *Flow Injection Analysis/FIA*), onde a separação das substâncias ocorre no EM. Este método é utilizado para otimização da fonte de

ionização e na quantificação de substâncias em alta velocidade de análise. A junção destas técnicas e a versatilidade das fontes de ionização IAP (ESI, APCI, APPI), permite a análise de substâncias de alta faixa molecular (50-3000 m/z) e diferentes polaridades, como também substâncias termoinstáveis (ABI, 2005).

3.10.2 ELETROSPRAY.

A ionização por EletroSpray (ou IonSpray) não é, na realidade um processo de ionização, mas um processo de transferência de íons em solução para a fase gasosa.

A ionização por EletroSpray gera íons através de um aerossol da solução aplicando uma carga voltaica através de uma sonda. Uma vez formado o spray do solvente contendo as substâncias iônicas, estas gotas são rapidamente desolvatadas pela adição de um aquecimento ou banho de gás ou ambos. A medida que o solvente evapora, os íons presentes “gota carregada” são ejetados. Os íons são guiados por eletrostática para o orifício de entrada do analisador de massas (ABI, 2005).

3.10.3 ANALISADOR DE MASSAS TIPO QUADRUPOLO

No analisador de massas quadrupolar, os íons são separados ou selecionados de acordo com sua m/z , aplicando-se um campo elétrico. Os íons tramitam no eixo central de quatro hastes dispostas em paralelo e equidistantes, onde são aplicadas voltagens DC (corrente direta) e AC (corrente alternada). Dependendo do campo aplicado e de sua força, apenas íons de massa/carga específica são selecionados e atingem o detector, sendo outros íons (não selecionados) defletidos e colididos com as hastes. Em resumo, funcionam como filtros de massa, onde a força e a frequência do campo elétrico aplicado filtram diferentes massas produzindo um espectro característico, dependendo do modo e operação utilizado (ABI, 2005).

Existem três tipos de voltagens presentes no quadrupolo: Radiofrequência (RF) fixa (ω), oscila em voltagem, que aumenta em amplitude de massas baixas para altas e mantém a trajetória harmônica dos íons; FDC – *Filtering DC* - diferença de potencial (DC) aplicada entre os pólos que definem a resolução, aumentando ou diminuindo a região, onde os íons são estáveis, este valor é variado e determinado pela tabela *Resolution Offset; Rod Offset Voltage* – Voltagem DC aplicada nos quadrupolos, criando um campo elétrico axial, relacionado com a velocidade de moção dos íons, quanto mais alta é a voltagem maior é a

velocidade dos íons, são menos resolvidos e atingem o detector com maior sensibilidade (ABI, 2005).

3.11 MÉTODOS MULTIMICOTOXINAS

FRISVAD e THRANE (1987) desenvolveram um dos primeiros métodos multimicotoxinas identificando 182 micotoxinas e metabólitos fúngicos de vários grupos usando CLAE-UV. Desde então, o poder de separação das atuais colunas CLAE tiveram um grande desenvolvimento como os novos matérias das fases estacionárias e a diminuição do tamanho dessas partículas. Atualmente mesmo analitos coeluidos cromatograficamente podem ser identificados usando detectores seletivos de massas.

A vantagem de se determinar várias micotoxinas em uma só corrida é que uma amostra pode estar contaminada com mais de uma micotoxina. Múltiplo estágios de EM desempenha um importante papel nesta questão por causa da sua alta sensibilidade de seletividade. Entretanto, não é fácil desenvolver um método multianalito devido às diferenças nas propriedades físico-químicas das diferentes micotoxinas sendo um desafio desde o preparo da amostra, passando pela purificação e separação cromatográfica, até a detecção e quantificação. Muitas vezes é necessária a mudança de polaridade do detector de massas durante a corrida.

3.12 EFEITO DA MATRIZ

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas tandem (CLAE-EM/EM) é uma poderosa técnica analítica para quantificação de análises de alimentos devido a sua inerente alta seletividade e sensibilidade. Entretanto é suscetível aos efeitos de matriz. O impacto do efeito da matriz na exatidão, precisão e robustez dos métodos analíticos é preocupação crescente na validação de métodos. Componentes residuais da matriz, fosfolipídios em particular, são uma fonte significativa de imprecisão em análises rotineiras quantitativas por CLAE-EM/EM. Efeito de matriz, originalmente no início dos anos 90, pode ser descrita como a diferença entre a resposta do espectrômetro de massas para um analito na solução padrão e a resposta para o mesmo analito em uma matriz biológica. O efeito da matriz resulta da coeluição de componentes da matriz que afetam a ionização do analito alvo, resultando em supressão iônica ou, em alguns casos, no aumento da ionização. O efeito matriz pode ser altamente variável sendo difícil controlá-lo ou prevê-lo. Eles são causados por numerosos fatores incluindo, mas não limitados a, por fosfolipídios, metabólitos, impurezas,

produtos de degradação ou outros componentes endógenos ou por modificadores da fase móvel. Além disso, diferentes fontes da mesma matriz podem fornecer resultados de validação diferente, tais como desvio angular da curva padrão e precisão. A natureza e a intensidade da supressão ou aumento do sinal pode ser uma função da concentração e da coeluição de componentes da matriz. Todos estes fatores podem causar erros significativos na exatidão e precisão dos métodos analíticos. Documentos de orientação do FDA (Food and Drug Administration) exigem que estes efeitos sejam avaliados como parte do desenvolvimento, validação e use na rotina dos métodos analíticos quantitativos por CLAE-EM/EM (CHAMBERS *et al.*, 2007).

Pesquisadores tem descrito este fenômeno como sendo devido ao efeito e desolvatação das gotas efluentes do CLAE no analisador de massas com eletrospray ou como resultado da competição pelo excesso de cargas na superfície da gota. (CHAMBERS *et al.*, 2007).

Entre os vários métodos publicados, existem dois mais utilizados que descrevem a avaliação do efeito da matriz: o método de infusão pós-coluna e o método de adição do padrão pós-extração. O método de infusão pós coluna fornece uma avaliação qualitativa do efeito de matriz, identificando as regiões do cromatograma com maior probabilidade de ocorrer o efeito de matriz. Isto é feito pelo monitoramento da resposta do instrumento a um analito injetado constantemente após a injeção de um extrato de uma amostra no sistema CLAE-EM/EM. Esta técnica permite uma modificação inteligente no tempo de eluição do analito para que não caia nas zonas de supressão. Entretanto, este processo pode consumir tempo e requer otimização significativa, particularmente se for para a quantificação de múltiplos analitos. Em contraste, o método de adição do padrão pós-extração avalia quantitativamente o efeito da matriz pelo comparação da resposta de um analito em uma solução pura com a resposta do analito em uma amostra branco da matriz contaminada artificialmente que foi preparada da mesma maneira que a amostra. Deste modo, efeitos quantitativos de supressão ou aumento da ionização sofrido por todos os analitos na amostra podem ser medidos cada vez que uma mudança é feita no método analítico (CHAMBERS *et al.*, 2007).

Enquanto a maioria dos pesquisadores inclui agora uma avaliação do efeito da matriz como parte do desenvolvimento do método, somente alguns tentam reduzir de fato ou eliminar o efeito da matriz. Alguns pesquisadores focam na otimização do preparo da amostra para reduzir o efeito da matriz, enquanto outros focam na manipulação de parâmetros cromatográficos. Outros avaliam o nível do efeito matriz e compensam a alteração do sinal

através do uso de um padrão interno, geralmente um isótopo estável marcado análogo do analito. Ainda outros descrevem o uso do fluxo intenso para reduzir os efeitos da matriz, ou a necessidade de recorrer à adição de padrão. Em alguns casos pesquisadores optam por usar uma fonte iônica, como APCI, que é menos sensível a este composto, simplesmente porque o efeito matriz é maior em uma fonte mais sensível. APCI tem mostrado, para algumas substâncias, menor supressão iônica e pode ser a melhor escolha para alguns ensaios na sensibilidade e exatidão/precisão, mas não é imune aos efeitos de matriz (CHAMBERS *et al.*, 2007).

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL E MÉTODO

4.1.1 REAGENTES QUÍMICOS E PADRÕES

O metanol e a acetonitrila (ambos grau HPLC) foram adquiridos da J.T. Baker; acetato de amônio (grau MS) e ácido acético glacial (p.a.) da Sigma–Aldrich (Viena, Áustria). A água foi purificada por osmose reversa e sistema Milli-Q plus da Millipore (Molsheim, France). Os padrões de micotoxinas foram adquiridos de diferentes fontes e foram dissolvidos em acetonitrila quando não mencionado o solvente. Soluções estoques de 3- e 15-acetil-desoxinivalenol, aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁, deepoxi-desoxinivalenol, desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, fumonisinas B₁, B₂ e B₃ (em acetonitrila/água 1:1, v/v), fusarenona X, toxina HT-2, fumonisina B₁ hidrolisada (em acetonitrila/água 1:1, v/v), neosolaniol, nivalenol, ocratoxinas A, B and α (este último em acetonitrila/água 1:1, v/v), patulina, toxina T-2, α - e β -zearalenol e zearalenona foram obtidas da Biopure Padrão de referência GmbH (Tulln, Áustria). Altenueno, alternariol, alternariol monometileter, bovericina, citrinina, citocalasina E, emodina, fumitremorgina C, gliotoxina, mevinolina, moniliformina (dissolvida em metanol), 15-monoacetoxiscirpenol, ácido micofenólico, paxilina, penitrem A, roridina A, esterigmatocistina, sulocrina, tentoxina, verrucarina A e verrucarol foram adquiridos da Sigma (Viena, Áustria). Chaetoglobosina A, chetomina, meleagrina e verruculogena foram comprados da Alexis Austria (Viena, Áustria). Agroclavina, chanoclavina, dihidrolisergol, elimoclavina, elimoclavina fructosídeo, ergina, erginina, ergotamina, ergotaminina, ergocornina, ergocorninina, ergocristina, ergocristinina, α -ergocriptina, α -ergocriptinina, ergometrina, ergometrinina, ergosina, ergosinina, festuclavina, lisergol, óxido de elimoclavina e óxido de luol foram cedidas pela Dra. Miroslav Flieger (Academia de Ciências da República Tcheca, Praga). Avenaceina Y, ácido giberílico e griseofulvina foram cedidos pelo Prof. Dr. Kristian Fog Nielsen (Universidade Técnica da Dinamarca, Lyngby). Diidroergotamina e metilsergida foram cedidas pelo Dr. Herbert Oberacher (Universidade Médica de Innsbruck, Áustria). Uma solução estoque de eniatina A, A1, B e B1 foram cedidas pela Dra. Marika Jestoi (Instituto Nacional de Pesquisa Veterinária e Alimentos, Finlândia). Alameticina-F30 foi cedida pelo Prof. Hans Brückner (Universidade de Giessen, Alemanha). Metansulfonato de dihidroergosina (dissolvida em metanol) foi fornecida pelo Dra. Danka Pericic (Instituto Ruder Boskovic, Zagreb, Croácia). Desoxinivalenol-3-glucosídeo foi isolado de trigo tratado desoxinivalenol; zearalenona-4-

glucosídeo (dissolvido em metanol) foi sintetizado e zearalenona-4-sulfate (dissolvido em metanol/água 1:1) foi extraído no laboratório da IFA a partir de arroz inoculado com *Fusarium graminearum*. Treze soluções trabalho foram preparadas com objetivo de realizar testes de recuperação com a contaminação das misturas de soluções estoques dos analitos correspondentes. As concentrações das soluções estoque e soluções finais de trabalho podem ser encontradas na Tabela 4. Todas as soluções foram estocadas a -20°C e deixadas à temperatura ambiente antes do uso.

4.1.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Um total de 119 amostras sendo 74 de milho, 36 de ração e 9 de resíduo de limpeza foram obtidas em uma fábrica de ração para frango no estado do Paraná, no Brasil, nos anos de 2005 e 2006. As amostras foram coletadas em três diferentes locais da fábrica: A) na recepção da fábrica 38 amostras de 7-10 kg de milho em grão foram retiradas aleatoriamente nos caminhões e devidamente identificadas; B) durante a pré-limpeza do milho 36 amostras de 10 kg de milho em grão foram coletadas e 9 amostras do resíduo da limpeza (7-10 kg) e C) 36 amostras de ração (3-5 kg) na granja integrada à fábrica.

A) Amostras de milho coletadas na recepção

De cada caminhão foi selecionada aleatoriamente uma amostra de 7 a 10 kg de milho em grão. No total 38 amostras de milho foram coletadas e identificadas de acordo com a procedência dos caminhões: A) Cooperativas (14 amostras); B) Pequenos produtores (12 amostras); C) Grandes produtores (12 amostras).

B) Amostras de milho coletadas nas etapas de pré-limpeza e secagem

O preprocessamento do milho cru para produção de ração inclui duas etapas de limpeza por peneiração para remoção dos grãos quebrados e danificados uma antes e outra depois da etapa de secagem. Foram coletadas 45 amostras de milho em grãos nas etapas listadas abaixo sendo que de cada etapa foram retiradas três amostras de 7 a 10 kg em três dias diferentes:

- A) Antes da primeira limpeza;
- B) depois da primeira limpeza;
- C) depois da secagem e antes da segunda limpeza;
- D) depois da secagem e segunda limpeza;
- E) rejeito da primeira limpeza.

Tabela 4: Concentrações dos padrões nas soluções estoque de trabalho final.

	Micotoxina	Solução Estoque (µg/mL)	Sol. Final (µg/mL)		Micotoxina	Solução Estoque (µg/mL)	Sol. Final (µg/mL)
Mix A	Esterigmatocistina	100	0,171	Mix B	Patulina	100,2	1,2830
em ACN	Penitrem A	50	0,256	em ACN	Citocalasina E	25	0,2134
	Emodina	50	0,171		Griseofulvina	100	0,4268
	Alternariol Monometileter	100	0,171		Ácido Giberelico	200	1,7073
	Ácido Micofenolico	100	0,478		Sulocrina	100	0,4268
	Citrinina	100	0,512		Gliotoxina	100	0,8537
	Roridina A	100	0,273		Mevilonina	100	0,8537
	Tentoxina	24,8	0,068		Fumitremorgina C	10	0,1280
	Altenueno	50	0,171		Paxilina	100	0,8537
Mix C	Caetoglobosina A	50	0,4268	Mix D	Metisergide	20	0,0138
em ACN	Verruculogeno	100	0,8537	em ACN	Ergocriptina	20	0,0138
	Cetomina	100	1,2805		Ergocornina	20	0,0138
	Meleagrina	100	0,4268		Ergocristinina	20	0,0138
	Verrucarol	50	0,4268		Ergosinina	20	0,0138
	Verrucarina	25	0,2134		Ergometrinina	250	0,0086
	Ácido Cojic	300	2,5610				
Mix E	Elimoclavin-Fructosidio	105,44	0,0720	Mix F	Ergosina	20	0,0217
em ACN	Festuclavina	20	0,0683	em ACN	Ergotamina	20	0,0217
	Cancoclavina	20	0,0683		Ergocristina	20	0,0217
	Agroclavina	20	0,0683		Ergocornina	20	0,0217
	Lisergol	20	0,0683		Ergocriptina	20	0,0217
	Luol oxidado	20	0,0683		Ergometrina	80	0,0434
	Elimoclavina	168,52	0,0575		Diidroergotamina	20	0,0217
	Diidrolisergol	20	0,0683		Diidroergosina	100	0,0043
	Ox-Elimoclavina	20	0,0683		Ergina	20	0,0217
					Ergovalina	200	0,0217
Mix G	Monoacetoxiscirpenol	50	0,1067	Mix 4	Nivalenol	10	0,8622
em ACN	alpha-ZOL	100	0,2134	em ACN	Desoxinivalenol	10	0,8537
	beta-ZOL	100	0,2134		Fusarenona X	10	0,8707
	alpha-ZOL-Gli	100	0,2134		3-ADON	10	0,8622
	beta-ZOL-Gli	100	0,2134		ZON	10	0,8707
	15-ADON	100,8	0,5378		T-2	10	0,8622
	Neosolanol	101,2	0,5399		HT-2	10	0,8707
	Deepoxy-DON	25,5	0,2721		Diacetoxiscirpenol	10	0,8707
	DON-Glucosid	50	0,2134				
	Ocratoxina B	50	0,2134				
	Ocratoxina A	10	0,2134				
	T2-Triol	200	0,8537				
	T2-Tetraol	200	0,8537				
Mix H	Moniliformin	57	3,8927	Mix I	Fumonisin B1	50,4	3,9337
em MeOH	Z4G	100	0,6829	em ACN/H₂O	Fumonisin B2	50,5	3,9415
	Alamethicin	1000	0,1707	1+1	Fumonisin B3	65	1,2683
	Z4S	30	0,0102		hydrolysiertes FB1	109,9	2,1444
					alpha OTA	9,085	0,2216
Mix J	Citocalasina A	100	0,4878	Enn Mix	Eniatina A	6	0,0006
em ACN	Citocalasina B	100	0,4878	em ACN	Enatina A ₁	38	0,0037
	Citocalasina C	100	0,4878		Eniatina B	40	0,0039
	Citocalasina D	100	0,4878		Eniatina B ₁	108	0,0105
	Citocalasina J	100	0,4878		Bovericina	100	0,0098
	Citocalasina H	100	0,4878		Enatina B ₃	100	0,0098
	HC-Toxin	100	0,4878				
	Brefeldina A	100	0,4878				
	Roquefortina	100	0,4878				
	Alternariol	200	0,4878				
	Toxina TA	200	0,4878				
Aflamix	Aflatoxin B1	0,25	0,0683				
	Aflatoxin B2	0,5	0,0171				
em ACN	Aflatoxin G1	0,25	0,0697				
	Aflatoxin G2	0,5	0,0171				

C) Amostras de ração coletadas nas granjas

O total de 36 amostras de ração para frango foi coletado em dois tipos de granja integrada à fábrica, com: A) Alimentação manual (6 granjas) e; B) Alimentação automática (6 granjas). De cada granja foram retiradas amostras de 3 -5 Kg de ração em três pontos: 1) No primeiro armazenamento; 2) No segundo armazenamento e; 3) No Comedouro dos frangos.

4.1.3 PREPARO DA AMOSTRA

Todas as amostras foram moídas em moinho de faca e martelo TREU 7.5CV (1720 rpm) com peneira de 1 mm (aproximadamente 20 mesh), homogeneizadas durante 15 min em homogeneizador Chopin MR10L. Após homogeneização uma subamostra de 1 kg foi retirada empregando-se o divisor de amostra Bender que foi embalada sob vácuo e armazenada a -18°C até o momento da análise.

4.1.4 EXTRAÇÃO DAS MICOTOXINAS

Foram pesadas 5 g de amostra em erlenmeyer de 100 mL e adicionados 20 mL de solvente de extração (acetonitrila/água/ácido acético 79:20:1, v/v/v) seguindo-se uma agitação durante 90 min em rotatório GFL 3017 (GFL, Burgwedel, Germany). O extrato foi filtrado empregando-se papel de filtro Whatman 595_1/2 (diam=150mm). Uma alíquota de 350 µL do extrato foi transferida para um frasco de vidro de 2mL (vial do CLAE) onde adicionou-se o mesmo volume (350 µL) de solvente de diluição (acetonitrila/água/ácido acético 20:79:1, v/v/v). Após suficiente homogeneização, 5 µL do extrato diluído foram injetados no sistema CLAE-EM/EM.

4.1.5 TESTE DE RECUPERAÇÃO

O teste de recuperação foi realizado empregando-se 3 amostras de milho e 3 amostras de ração em duplicata. Quinhentos miligramas (0,5 g) de cada amostra (milho ou ração) foram contaminados artificialmente com uma combinação de 11 soluções de trabalho contendo uma mistura dos padrões das micotoxinas avaliadas. Após a adição da mistura de soluções padrões as amostras foram deixadas à temperatura ambiente e sob o abrigo da luz por um dia para evaporação do solvente. Depois deste período, 2 mL do solvente de extração (acetonitrila/água/ácido acético 79:20:1, v/v/v) foram adicionados e foi seguido o mesmo procedimento de extração utilizado nas amostras. Como todas as amostras estavam naturalmente contaminadas com fumonisinas (média da contaminação inicial de FB190 ± 49

$\mu\text{g}/\text{kg}$, FB2 $27 \pm 24 \mu\text{g}/\text{kg}$ e FB3 $13 \pm 7 \mu\text{g}/\text{kg}$), foram utilizadas amostras de milho e ração com o menor nível de contaminação e este valor foi considerado no cálculo. Os níveis de contaminação para cada micotoxina estão descritos junto com os resultados obtidos no próximo capítulo.

A Recuperação foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = (C_1 - C_2) \times 100/C_3$$

onde:

C_1 = concentração determinada na amostra adicionada,

C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada,

C_3 = concentração adicionada

4.1.6 PARÂMETROS INSTRUMENTAIS

A detecção e a quantificação das amostras foram realizadas em um sistema CLAE-EM/EM Qtrap 4000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado com um sistema CLAE série 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) e uma fonte de ionização electrospray TurboIonSpray (ESI). A separação cromatográfica foi realizada a 25°C em uma coluna C18 Gemini®, $150 \times 4.6\text{-mm}$ i.d., tamanho da partícula $5\text{-}\mu\text{m}$, equipado com uma pré-coluna C18 $4 \times 3\text{-mm}$ -i.d. (todos Phenomenex, Torrance, CA, US). A fase móvel empregada consistiu-se de Metanol:H₂O:Ácido acético 10:89:1 (v/v/v; eluente A) e Metanol:H₂O:Ácido acético 97:2:1 (eluente B). Ambos eluentes continham 5 mM de acetado de amônio. O gradiente de eluição empregado foi: depois dos 2 min. iniciais a 100% de A, a proporção de B foi aumentada linearmente até 100% em 12 min, seguido por uma manutenção de 3 min de 100% de B e 4 min para reequilibrar a coluna com 100% de A. O fluxo empregado foi de 1 mL/min. O espectro de massas com ionização por electrospray (IES-EM/EM) foi realizado no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) em ambas as polaridades positiva e negativa em duas corridas cromatográficas diferentes por amostra com varredura de fragmentos por analito com os seguintes ajustes: temperatura da fonte 550°C , cortina de gás 10 psi (69 kPa de max. 99.5% nitrogênio), fonte iônica de gás 1 (sheath gas) 50 psi (345 kPa de nitrogênio), fonte iônica de gás 2 (drying gas) 50 psi (345 kPa de nitrogênio), voltagem do ion spray $-4,000\text{ V}$ e $+4000\text{ V}$ respectivamente, Alto gás de colisão (nitrogênio). O aumento da produção de íons de amostras contaminadas foi adquirido usando o terceiro quadrupolo linear como ion trap aplicando um tempo de preenchimento dinâmico, enquanto outros parâmetros foram

estabelecidos de acordo com os valores ótimos determinados para cada analito, respectivamente. A relação dos tempos de retenção, os íons selecionados para quantificação e qualificação de cada micotoxina (íon precursor e íons produtos), assim como outros parâmetros de voltagem estão descritos na Tabela 5.

4.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS

4.2.1 AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DAS SUBAMOSTRAS E QUANTIDADE IDEAL DE SUBAMOSTRA ANALÍTICA A SER TOMADA PARA QUANTIFICAÇÃO DAS TOXINAS EM AMOSTRAS NATURALMENTE CONTAMINADAS.

A fim de avaliar a homogeneidade das subamostras e quantidade ideal de subamostra analítica a ser tomada para extração e quantificação das micotoxinas em amostras naturalmente contaminadas, três subamostras de milho foram avaliadas em triplicata em 3 (três) empregando-se quantidades diferentes de tomada de subamostra analítica: 1g, 5g e 25g. O solvente de extração (acetonitrila/água/ácido acético 79:20:1, v/v/v) foi adicionado na proporção de 1:4, ou seja 4, 20 e 100 mL respectivamente. Seguiu-se o mesmo procedimento utilizado nas amostras: agitação, filtração, diluição e injeção no sistema CLAE-EM/EM.

4.2.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ

Para a avaliação do efeito matriz uma amostra de milho e outra de ração foram contaminadas artificialmente com uma mistura de padrões das 101 micotoxinas em três níveis diferentes de contaminação para cada micotoxina. A amostra e o extrato da amostra foram contaminados em níveis equivalentes conforme descritos na Tabela 10. O nível intermediário foi feito em duplicata. Foi seguido o mesmo procedimento de agitação, filtração, diluição e injeção no sistema CLAE-EM/EM utilizado nas amostras. Foram calculados a regressão linear e o desvio angular das três curvas obtidas: do padrão, das amostras e dos extratos artificialmente contaminados. Para diferenciar entre eficiência de extração e efeito da matriz, a razão dos desvios angulares das funções das curvas de calibração foram calculadas para fornecer a recuperação aparente (RA), o efeito da matriz (EM) e a recuperação da etapa de extração (RE) utilizando as fórmulas abaixo:

Efeito da Matriz

$$EM (\%) = 100 \times \frac{\text{desvio angular da curva do extrato contaminado}}{\text{desvio angular da curva do padrão}}$$

Recuperação Aparente

$$RA (\%) = 100 \times \frac{\text{desvio angular da curva da amostra contaminada}}{\text{desvio angular da curva do padrão}}$$

Eficiência da Extração:

$$EE (\%) = 100 \times \frac{\text{desvio angular da curva da amostra contaminada}}{\text{desvio angular da curva do extrato contaminado}}$$

Os limites de detecção (LODs) foram estimados na menores níveis de de concentração avaliado tanto nas amostras artificialmente contaminadas quanto nas concentrações correspondentes dos padrões puros para uma razão sinal/ruído (S/N) de 1:3.

Tablea 5: Parâmetros otimizados para obtenção do espectro de massas com ionização por electrospray (IES-EM/EM)

Analito	t _R ^a (min)	ion precursor (m/z)	PD ^b (V)	ions produto (m/z)	IR ^d	EC ^e (V) ^e	PC ^f (V) ^e	Período	Dwell time (ms) ^g
Fumonisin									
Fumonisin B ₁ (FB ₁)	12,91	722,5 [M+H] ⁺	91	334,4/352,3	0,78	57/55	4/12	+6	100/25
Fumonisin B ₂ (FB ₂)	14,12	706,3 [M+H] ⁺	96	336,3/318,5	0,47	59/51	8/2	+8	75/25
Fumonisin B ₃ (FB ₃)	13,53	706,3 [M+H] ⁺	96	336,3/318,5	0,40	59/51	8/2	+7	75/25
Fumonisin B ₁ hidrolisada (HFB ₁)	12,03	406,3 [M+H] ⁺	86	370,3/388,3	0,88	29/27	10/20	+5	60/20
Aflatoxinas									
Aflatoxina B ₁ (AFL B ₁)	12,16	313,0 [M+H] ⁺	76	285,2/128,1	0,65	33/91	16/10	+5	60/20
Aflatoxina G ₁ (AFL G ₁)	11,51	329,0 [M+H] ⁺	56	243,2/200,0	0,60	39/59	14/12	+4	60/20
Aflatoxina B ₂ (AFL B ₂)	11,87	315,1 [M+H] ⁺	66	287,2/259,2	0,85	37/43	18/18	+5	60/20
Aflatoxina G ₂ (AFL G ₂)	11,16	331,1 [M+H] ⁺	81	313,2/245,2	0,69	35/43	18/14	+4	60/20
Ocratoxinas									
Ocratoxina A (OTA)	14,69	404,0 [M+H] ⁺	61	239,0/102,0	0,53	37/105	16/14	+8	75/25
Ocratoxina B (OTB)	13,81	370,1 [M+H] ⁺	56	205,0/103,2	0,48	33/77	12/16	+7	75/25
Ocratoxina α (OTα)	13,17	254,9 [M-H] ⁻	-60	210,9/166,9	0,87	-24/-36	-11/-11	-3	100/100
Zearalenona e derivados									
Zearalenona (ZON)	14,62	317,1 [M-H] ⁻	-80	131,1/175,0	0,98	-42/-34	-8/-13	-4	100/50
Zearalenona-4-sulfato (ZON4S)	14,32	397,1 [M-H] ⁻	-75	317,1/175,0	0,17	-32/-48	-15/-13	-4	100/50
α-Zearalenol (α-ZOL)	13,92	319,2 [M-H] ⁻	-85	160,0/130,0	0,96	-44/-50	-13/-20	-4	100/50
β-Zearalenol (β-ZOL)	14,53	319,2 [M-H] ⁻	-85	160,0/130,0	0,89	-44/-50	-13/-20	-4	100/50
Zearalenona-4-glicosido (ZON4G)	12,89	479,2 [M-H] ⁻	-65	317,1/175,0	0,11	-24/-56	-17/-9	-3	100/100
α-Zearalenol-glicosido (α-ZOLG)	12,91	541,3 [M-H] ⁻	-75	481,1/319,1	0,12	-32/-48	15/-13	-3	100/50
β-Zearalenol-glicosido (β-ZOLG)	11,95	541,3 [M-H] ⁻	-75	481,1/319,1	0,16	-32/-48	15/-13	-3	100/50
Hexadepsipeptidos									
Bovericina (BEA)	16,03	801,5 [M+NH ₄] ⁺ 806,5 [M+Na] ⁺	86 161	244,2 384,4	2,29	47/73	12/10	+9	60/20
Eniatina A (EA)	16,26	699,4 [M+NH ₄] ⁺	76	210,1/228,0	0,31	43/47	12/18	+9	60/20
Eniatina A ₁ (EA ₁)	16,12	685,4 [M+NH ₄] ⁺	66	210,1/228,2	0,67	41/49	8/20	+9	60/20
Eniatina B (EB)	15,80	657,5 [M+NH ₄] ⁺	51	196,3/214,1	0,52	45/47	18/18	+9	60/20
Eniatina B ₁ (EB ₁)	15,97	671,4 [M+NH ₄] ⁺	81	196,0/210,0	0,73	43/41	12/12	+9	60/20
Eniatina B ₃ (EB ₃)	15,75	629,4 [M+NH ₄] ⁺	61	196,3/214,3	0,45	42/40	10/16	+9	60/20
Alcaloides do Ergot									
Agroclavina	8,94	239,1 [M+H] ⁺	56	183,2/208,2	0,88	27/27	12/10	+3	60/20
Canoclavina	7,83	257,1 [M+H] ⁺	46	168,2/226,2	0,92	27/17	10/14	+2	100/50
Festuclavina	9,01	241,2 [M+H] ⁺	76	154,2/168,2	0,67	47/39	10/10	+3	60/20
Elimoclavina	7,18	255,1 [M+H] ⁺	61	181,2/180,2	0,97	41/57	10/10	+2	100/50
Elimoclavina frutossido	6,55	417,2 [M+H] ⁺	61	255,2/237,3	0,34	29/33	18/20	+1	100/100
Elimoclavina oxidado	5,31	259,1 [M+H] ⁺	61	184,2/156,1	0,40	27/29	8/10	+1	100/100
Ergina	6,50	268,1 [M+H] ⁺	56	223,2/208,2	0,74	29/35	14/10	+1	100/100
Ergotamina	11,49	582,2 [M+H] ⁺	66	223,2/208,2	0,31	47/59	12/14	+4	60/20
Diidroergotamina	11,43	584,3 [M+H] ⁺	81	270,3/253,2	0,70	43/47	16/14	+4	60/20
Ergocornina	11,36	562,2 [M+H] ⁺	56	223,2/208,2	0,55	47/63	12/12	+4	60/20
Ergocorninina	12,45	562,2 [M+H] ⁺	51	544,2/223,2	0,52	21/47	16/12	+6	100/25
Ergocristina	12,04	610,4 [M+H] ⁺	56	592,4/223,2	0,84	21/47	18/12	+5	60/20
Ergocristinina	13,19	610,4 [M+H] ⁺	46	592,5/223,3	0,51	21/47	18/12	+6	100/25
α-Ergocriptina	11,89	576,4 [M+H] ⁺	51	223,3/208,2	0,57	47/61	14/16	+5	60/20
α-Ergocriptinina	12,90	576,4 [M+H] ⁺	51	558,4/223,3	0,69	21/49	16/12	+6	100/25
Ergometrina	7,17	326,2 [M+H] ⁺	66	223,2/208,2	0,39	39/35	14/14	+2	100/100
Ergometrinina	7,27	326,2 [M+H] ⁺	51	208,2/223,2	0,34	47/59	12/14	+2	60/20
Ergosina	11,18	548,4 [M+H] ⁺	56	223,2/208,2	0,32	45/57	14/12	+4	60/20
Ergosinina	10,99	548,4 [M+H] ⁺	56	223,2/208,2	0,15	45/57	14/12	+4	60/20
Diidroergosina	11,11	550,2 [M+H] ⁺	96	270,1/253,0	0,46	47/43	16/16	+4	60/20
Ergovalina	11,32	582,2 [M+H] ⁺	66	223,2/208,2	0,17	47/59	12/14	+4	60/20
Luol oxidado	5,94	291,5 [M+H] ⁺	41	259,3/201,2	0,73	25/37	22/12	+1	100/100
Lisergol	7,20	255,1 [M+H] ⁺	61	240,2/197,2	0,78	29/33	14/12	+2	100/50
Diidrolisergol	7,16	257,1 [M+H] ⁺	81	167,2/154,2	1,00	55/55	10/8	+2	100/50
Metilsergide	9,32	354,2 [M+H] ⁺	61	237,2/222,2	0,70	35/41	12/14	+3	60/20

Tablea 5: Parâmetros otimizados para obtenção do espectro de massas com ionização por electrospray (IES-EM/EM) (continuação)

Analito	t _R ^a (min)	ion precursor (m/z)	DP ^b (V)	ions produto ^c (m/z)	IR ^d	CE ^e (V) ^e	CXP ^f (V) ^e	Periodo	Dwell time (ms) ^e
Tricotecenos									
Desoxinivalenol (DON)	7,59	355,1 [M+Ac] ⁻	-40	265,2/59,2	4,72	-22/-40	-13/-8	-1	100/100
Desoxinivalenol-3-glicosidio	7,61	517,3 [M+Ac] ⁻	-50	427,1/59,1	1,37	-30/-85	-11/-7	-1	100/100
3-Acetildesoxinivalenol (3AcDON)	10,41	397,1 [M+Ac] ⁻	-40	307,1/59,1	6,37	-20/-38	-7/-8	-2	100/100
15-Acetildesoxinivalenol	10,35	339,1 [M+H] ⁺	61	321,3/137,2	0,69	13/17	18/8	+3	60/20
Nivalenol (NIV)	5,48	371,1 [M+Ac] ⁻	-45	281,1/59,1	1,55	-22/-42	-15/-7	-1	100/100
Deepoxidodesoxinivalenol (DOM-1)	9,09	339,1 [M+Ac] ⁻	-40	59,1/248,9	0,10	-20/-18	-9/-17	-2	100/100
Fusarenona X (F-X)	8,92	413,3 [M+Ac] ⁻	-40	262,2/59,1	3,93	-22/-44	-16/-9	-2	100/100
Toxina HT-2 (HT2)	13,08	442,2 [M+NH ₄] ⁺ 447,4 [M+Na] ⁺	46 101	263,1 345,1	5,18	21/27	19/20	+6	100/25
Toxina T-2 (T2)	13,67	484,3 [M+NH ₄] ⁺	56	215,2/185,1	0,82	29/31	18/11	+7	75/25
Neosolanol (NEO)	9,24	400,2 [M+NH ₄] ⁺	46	215,1/185,0	0,90	25/29	12/14	+3	60/20
Monoacetoxiscirpenol (MAS)	11,06	342,2 [M+NH ₄] ⁺	41	265,0/307,0	0,42	13/13	26/8	+4	60/20
Diacetoxiscirpenol (DAS)	11,94	384,2 [M+NH ₄] ⁺	51	307,2/105,1	0,54	17/61	9/7	+5	60/20
Verrucarol	9,71	267,0 [M+NH ₄] ⁺	56	249,1/219,0	0,64	11/15	8/14	+3	60/20
Verrucarina	13,74	520,2 [M+NH ₄] ⁺	51	249,1/457,1	0,38	25/19	14/14	+7	75/25
Roridina A	13,85	550,4 [M+NH ₄] ⁺	41	249,2/231,3	0,39	25/29	48/12	+7	75/25
T2-Tetraol	5,80	316,2 [M+NH ₄] ⁺		215,1/281,4	0,43	29/31	18/11	+1	75/25
T2-Triol	12,32	400,2 [M+NH ₄] ⁺		281,3/215,2	0,55	25/29	12/14	+5	75/25
Outras									
Moniliformina (MON)	3,38	96,9 [M-H] ⁻	-70	41,2	-	-24	-5	-1	100
Ácido Cójico,	3,22	143,0 [M+H] ⁺	75	113,2/69,2	0,90	25/29	12/14	+1	100
Emodina	16,24	269,0 [M-H] ⁻	-70	224,9/240,9	0,32	-38/-38	-11/-13	-4	100/50
Brefeldina A	13,46	281,0 [M+H] ⁺	30	245,5/263,3	0,90	25/29	12/14	+6	100/100
Roquefortina C	12,47	390,2 [M+H] ⁺	60	193,2/322,3	0,87	33/19	16/18	+5	100/100
Ácido gibberelico	10,38	364,3 [M+NH ₄] ⁺	36	239,2/221,2	0,52	23/35	14/12	+3	60/20
Patulina (PAT)	5,58	152,9 [M-H] ⁻	-20	108,9/135,0	0,04	-12/-12	-9/-9	-1	100/100
Gliotoxina	12,23	327,1 [M+H] ⁺	31	263,2/245,2	0,61	15/25	16/20	+5	60/20
Fumitremorgina C	13,79	380,3 [M+H] ⁺	61	212,3/324,3	0,32	45/23	12/8	+7	75/25
Altenueno	12,14	293,2 [M+H] ⁺	36	257,2/275,2	0,39	21/15	16/16	+5	60/20
Alternariol	14,17	257,0 [M-H] ⁻	-70	212,9/214,9	0,39	25/29	48/12	-4	60/20
Alternariolmonometileter	15,29	271,1 [M-H] ⁻	-65	256,0/227,0	0,16	-32/-50	-13/-9	-4	100/50
Esterigmatocistina (SMC)	14,89	325,1 [M+H] ⁺	66	310,2/281,1	1,10	35/51	18/16	+8	75/25
Citrinina (CTN)	14,56	251,0 [M+H] ⁺	26	233,0/205,2	0,12	25/39	14/12	+8	75/25
Citocalasina A	14,91	478,2 [M+NH ₄] ⁺	26	460,5/120,2	0,12	25/39	14/12	+8	75/25
Citocalasina B	13,74	480,2 [M+NH ₄] ⁺	26	462,5/444,5	0,12	25/39	16/18	+7	75/25
Citocalasina C	15,46	525,2 [M+NH ₄] ⁺	26	430,5/490,5	0,12	25/39	14/12	+6	75/25
Citocalasina D	13,97	525,2 [M+NH ₄] ⁺	26	430,5/490,5	0,12	25/39	14/12	+7	75/25
Citocalasina E	14,12	513,3 [M+NH ₄] ⁺	41	416,4/434,5	0,64	19/17	12/12	+8	75/25
Citocalasina H	13,74	494,2 [M+NH ₄] ⁺	26	434,5/416,5	0,12	25/39	14/12	+7	75/25
Citocalasina J	13,23	452,2 [M+NH ₄] ⁺	26	416,5/434,5	0,12	25/39	14/12	+6	75/25
Mevinolina	15,80	405,4 [M+H] ⁺	46	199,2/173,3	0,64	17/29	14/10	+9	60/20
Ácido micofenólico	13,72	338,1 [M+NH ₄] ⁺	31	207,2/303,2	0,87	33/19	16/18	+7	75/25
Paxillina	15,91	436,4 [M+H] ⁺	36	182,2/167,2	0,5	841/89	10/10	+9	60/20
Penitrem A	15,62	634,4 [M+H] ⁺	51	558,5/616,4	0,25	27/17	16/10	+9	60/20
Sulocrina	11,93	333,2 [M+H] ⁺	26	209,1/136,2	0,13	17/59	12/8	+5	60/20
Tentoxina	13,57	413,3 [M-H] ⁻	-65	141,0/271,1	0,16	-32/-50	-13/-9	-4	100/50
Caetoglobosina A	14,65	529,4 [M+H] ⁺	76	130,2/511,3	0,29	59/15	8/14	+8	75/25
Cetomina	14,63	711,2 [M+H] ⁺	66	298,2/348,2	0,53	25/21	10/18	+8	75/25
Meleagrín	11,21	434,3 [M+H] ⁺	51	403,3/334,2	0,53	23/33	12/20	+4	60/20
Verruculogeno	14,95	512,3 [M+H] ⁺	16	352,2/494,2	1,06	23/13	10/14	+8	75/25
Griseofulvina	13,20	353,2 [M+H] ⁺	51	165,2/215,2	0,91	27/27	10/12	+6	100/25
Alameticina-F30	16,04	775,5 [γ7 ⁹ +H] ⁺	81	282,3/197,2	0,62	71/55	28/20	+9	60/20
Toxina AAL TA	11,92	522,3 [M+H] ⁺	36	328,5/292,4	0,39	21/15	16/16	+5	60/20
Toxina HC	10,86	435,2 [M-H] ⁻	-65	184,0/113,1	0,16	-32/-50	-13/-9	-3	100/50

a) Tempo de retenção b) Potencial de Dessolvatação c) Os valores são dados na ordem: íon de quantificação/íon de qualificação.

d) Intensidade da transição de quantificação/intensidade da transição de qualificação e) Energia de colisão

f) Potencial da célula de saída g) Fragmento na-fonte obtido da quebra da ligação peptídica correspondente

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A importância da pesquisa sobre contaminação de alimentos por micotoxinas ganhou muita atenção durante as últimas décadas. A coocorrência de micotoxinas afeta a toxicidade dos grãos contaminados resultando em efeitos sinérgicos. A incidência de micotoxinas em milho, tanto no Brasil como em outras partes do mundo, costuma ser alta e variada, pois este é um produto muito suscetível à contaminação fúngica (FIGUEIRA *et al.*, 2003). A investigação de micotoxinas em milho é importante na indústria avícola especialmente para estudos toxicológicos que poderiam indicar quais toxinas poderiam estar presentes. Por isso existe a necessidade do desenvolvimento de um método analítico abrangendo uma gama alta de micotoxinas, tornando-se uma ferramenta muito útil em laboratório.

O método de CLAE-EM/EM usado neste estudo constituiu-se numa alternativa para as técnicas convencionais de análise de micotoxinas mostrando boa sensibilidade, rapidez e aplicabilidade em matrizes complexas como milho e ração a base de milho. Além disso, possibilita a análise simultânea de várias micotoxinas de diferentes classes químicas podendo ser aplicado então como método rotineiro para diferentes tipos de alimentos com gastos reduzidos de materiais e de tempo com alta confiabilidade.

As maioria dos métodos convencionais analisam apenas uma micotoxina ou um grupo de micotoxinas de classe química semelhante. Cada um destes procedimentos utiliza um solvente de extração, um tipo de purificação e quantificação diferentes, além disso, algumas micotoxinas necessitam de derivatização tanto para a análise quanto para confirmação. A grande vantagem do método aplicado neste estudo, por CLAE-EM/EM, é permitir a análise simultânea de 101 micotoxinas de diferentes classes químicas e em curto tempo (~45 min), sem purificação do extrato da amostra ou necessidade de reação de derivatização além da confirmação segura do analito. Após uma extração simples e filtração, a amostra é diluída em solvente mais polar que o da extração e injetada no sistema CLAE-EM/EM. A separação cromatográfica em coluna de fase reversa é realizada em gradiente com dois sistemas de solvente, ambos acidificados e com adição de acetato de amônio para inibir a formação de adutos de sódio. Na fonte iônica Eletronspray (ESI) os íons são gerados através de um aerossol da solução aplicando uma carga voltaica através de uma sonda. Ocorre a evaporação do solvente e os íons gerados são então rapidamente desolvatadas das gotículas geradas pelo spray pela adição de um aquecimento ou banho de gás ou ambos. Dependendo da natureza da micotoxina, podem ser gerados mais facilmente íons com carga positiva ou negativa. Os íons

são guiados por eletrostática para o orifício de entrada do analisador de massas de acordo com a polaridade cone positiva (modo positivo) ou negativa (modo negativo).

Neste experimento, cento e uma micotoxinas foram analisadas em duas corridas: uma em modo positivo, onde são analisadas as 80 micotoxinas que fornecem preferencialmente íons positivos quando ionizadas; e outra em modo negativo, onde são analisadas 21 micotoxinas que se ionizam negativamente (Tabela 5 a 7). Através do monitoramento de reações múltiplas (MRM) é possível analisar inclusive substâncias que coeluem ou não tem boa resolução cromatográfica, desde que forneçam fragmentos de m/z distintos. No primeiro quadrupolo é selecionado um íon (geralmente o íon pseudo-molecular) no segundo quadrupolo o íon é fragmentado pela adição de argônio na célula de colisão, e no terceiro quadrupolo é selecionado o fragmento de maior intensidade e que seja característico da molécula. Cada micotoxina é analisada em duas transições uma para quantificação e outra para confirmação permitindo assim a identificação inequívoca de cada analito.

Na Tabela 6 estão listadas as 21 micotoxinas analisadas no modo negativo de acordo com a ordem de eluição, tempo de retenção e com as respectivas transições de quantificação e qualificação analisadas. Na Figura 14 pode ser observado o cromatograma de íons totais no modo negativo da mistura de 21 padrões de micotoxinas injetados. As linhas verticais indicam as mudanças de períodos, em cada período são avaliadas diferentes transições referentes às toxinas que eluem no respectivo intervalo de tempo.

Na Tabela 7 estão listadas as 80 micotoxinas analisadas no modo positivo de acordo com a ordem de eluição, tempo de retenção e com as respectivas transições de quantificação e qualificação analisadas. Na Figura 15, além do cromatograma de íons totais no modo positivo da mistura de 101 padrões de micotoxinas injetados, também é mostrado o espectro de massas referente ao período selecionado e os picos referentes às duas transições de FB₁, uma de quantificação (722,5→352,3) e outra de confirmação (722,5→334,4). Na Figura 16 é sugerido um esquema de fragmentação para a fumonisina B₁ com as transições analisadas. Além de perda de uma ou mais moléculas de água, a perda de grupamentos neutros, como ácido tricarboxílico (ATC), ocorre facilmente com rompimento da ligação ester, gerando fragmentos característicos da estrutura das fumonisinas. Na escolha das transições para análise por espectrometria de massas por eletrospray, geralmente seleciona-se o íon pseudo molecular $[M+H]^+$ no primeiro quadrupolo e um fragmento mais intenso e/ou característico

no segundo quadrupolo. SEWRAM et al. (2005) sugerem outras possibilidades para a fragmentação de para análogos das fumonisinas B e C.

Tabela 6: Relação das 21 micotoxinas analisadas no modo negativo de acordo com a ordem de eluição, tempo de retenção e com as respectivas transições de quantificação e qualificação analisadas.

Período	t _R ^a (min)	Micotoxina	Transição de quantificação (m/z)	Transição de confirmação (m/z)
1	3,38	Moniliformina (MON)	96,9 → 41,2	-
	5,48	Nivalenol (NIV)	371,1 → 281,1	371,1 → 59,1
	5,58	Patulina (PAT)	152,9 → 108,9	152,9 → 135,0
	7,59	Desoxinivalenol (DON)	355,1 → 265,2	355,1 → 59,2
	7,61	Desoxinivalenol-3-glicosídeo	517,3 → 427,1	517,3 → 59,1
2	8,92	Fusarenona X (F-X)	413,3 → 262,2	413,3 → 59,1
	9,09	Deepoxidesoxinivalenol	339,1 → 59,1	339,1 → 248,9
	10,41	3-Acetil-desoxinivalenol	397,1 → 307,1	397,1 → 59,1
3	10,86	Toxina HC	435,2 → 184,0	435,2 → 113,1
	11,95	β-Zearalenol-glicosídeo	541,3 → 481,1	541,3 → 319,1
	12,89	Zearalenona-4-glicosídeo	479,2 → 317,1	479,2 → 175,0
	12,91	α-Zearalenol-glicosídeo	541,3 → 481,1	541,3 → 319,1
	13,17	Ocratoxina α (OTα)	254,9 → 210,9	254,9 → 166,9
4	13,57	Tentoxina	413,3 → 141,0	413,3 → 271,1
	13,92	α-Zearalenol (α-ZOL)	319,2 → 160,0	319,2 → 130,0
	14,17	Alternariol	257,0 → 212,9	257,0 → 214,9
	14,32	Zearalenona-4-sulfato	397,1 → 317,1	397,1 → 175,0
	14,53	β-Zearalenol (β-ZOL)	319,2 → 160,0	319,2 → 130,0
	14,62	Zearalenona (ZON)	317,1 → 131,1	317,1 → 175,0
	15,29	Alternariolmonometileter	271,1 → 256,0	271,1 → 227,0
	16,24	Emodina	269,0 → 224,9	269,0 → 240,9

a) t_R = Tempo de retenção

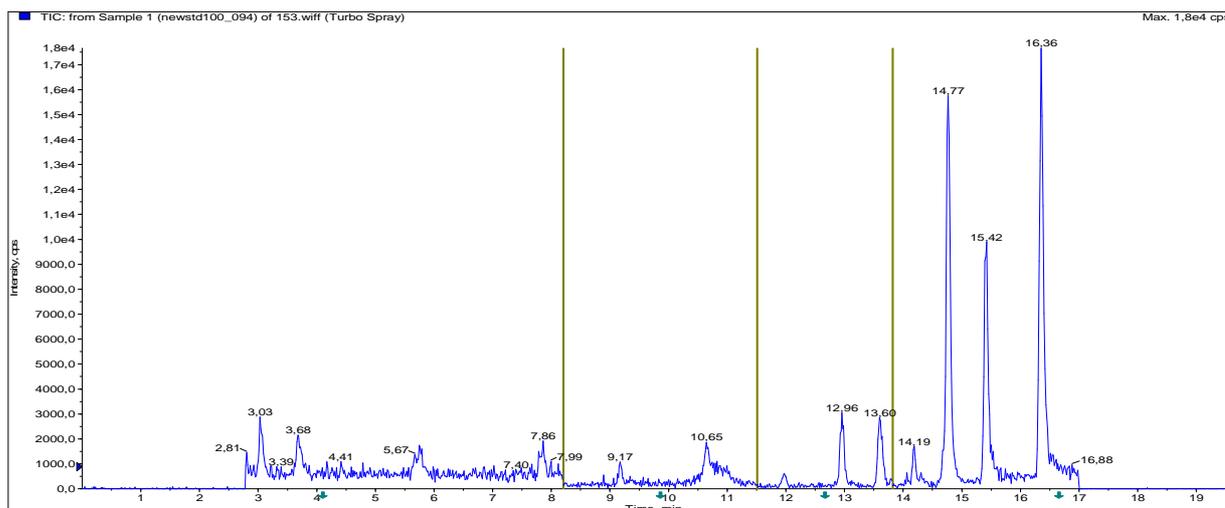


Figura 14: Cromatograma de íons totais no modo negativo da mistura de padrões de 21 micotoxinas obtido por CLAE-EM/EM (ESI).

Tabela 7: Relação das 80 micotoxinas analisadas no modo positivo de acordo com a ordem de eluição, tempo de retenção e com as respectivas transições de quantificação e qualificação analisadas.

Período	t _R ^a (min)	Analito	Transição de quantificação (m/z)	Transição de confirmação (m/z)
1	3,22	Ácido Cójico	143,0 → 113,2	143,0 → 69,2
	5,31	Elimoclavina oxidado	259,1 → 184,2	259,1 → 156,1
	5,80	T2-Tetraol	316,2 → 215,1	316,2 → 281,4
	5,94	Luol oxidado	291,5 → 259,3	291,5 → 201,2
	6,50	Ergina	268,1 → 223,2	268,1 → 208,2
	6,55	Elimoclavina frutossídio	417,2 → 255,2	417,2 → 237,3
2	7,16	Diidrolisergol	257,1 → 167,2	257,1 → 154,2
	7,17	Ergometrina	326,2 → 223,2	326,2 → 208,2
	7,18	Elimoclavina	255,1 → 181,2	255,1 → 180,2
	7,20	Lisergol	255,1 → 240,2	255,1 → 197,2
	7,27	Ergometrinina	326,2 → 208,2	326,2 → 223,2
	7,83	Canoclavina	257,1 → 168,2	257,1 → 226,2
	3	8,94	Agroclavina	239,1 → 183,2
9,01		Festuclavina	241,2 → 154,2	241,2 → 168,2
9,24		Neosolanol (NEO)	400,2 → 215,1	400,2 → 185,0
9,32		Metisergide	354,2 → 237,2	354,2 → 222,2
9,71		Verrucarol	267,0 → 249,1	267,0 → 219,0
10,35		15-Acetil-desoxinivalenol	339,1 → 321,3	339,1 → 137,2
10,38		Ácido gibberelico	364,3 → 239,2	364,3 → 221,2
4		10,99	Ergosinina	548,4 → 223,2
	11,06	Monoacetoxiscirpenol (MAS)	342,2 → 265,0	342,2 → 307,0
	11,11	Diidroergosina	550,2 → 270,1	550,2 → 253,0
	11,16	Aflatoxina G ₂ (AFL G ₂)	331,1 → 313,2	331,1 → 245,2
	11,18	Ergosina	548,4 → 223,2	548,4 → 208,2
	11,21	Meleagrín	434,3 → 403,3	434,3 → 334,2
	11,32	Ergovalna	582,2 → 223,2	582,2 → 208,2
	11,36	Ergocornina	562,2 → 223,2	562,2 → 208,2
	11,43	Dihidroergotamina	584,3 → 270,3	584,3 → 253,2
	11,49	Ergotamina	582,2 → 223,2	582,2 → 208,2
	11,51	Aflatoxina G ₁ (AFL G ₁)	329,0 → 243,2	329,0 → 200,0
5	11,87	Aflatoxina B ₂ (AFL B ₂)	315,1 → 287,2	315,1 → 259,2
	11,89	α-Ergocriptina	576,4 → 223,3	576,4 → 208,2
	11,92	Toxina AAL TA	522,3 → 328,5	522,3 → 292,4
	11,93	Sulocrina	333,2 → 209,1	333,2 → 136,2
	11,94	Diacetoxiscirpenol (DAS)	384,2 → 307,2	384,2 → 105,1
	12,03	Fumonisina B ₁ hidrolisada (HFB ₁)	406,3 → 370,3	406,3 → 388,3
	12,04	Ergocristina	610,4 → 592,4	610,4 → 223,2
	12,14	Altenueno	293,2 → 257,2	293,2 → 275,2
	12,16	Aflatoxina B ₁ (AFL B ₁)	313,0 → 285,2	313,0 → 128,1
	12,23	Gliotoxina	327,1 → 263,2	327,1 → 245,2
	12,32	T2-Triol	400,2 → 281,3	400,2 → 215,2

Tabela 7: Relação das 80 micotoxinas analisadas no modo positivo de acordo com a ordem de eluição, tempo de retenção e com as respectivas transições de quantificação e qualificação analisadas (continuação).

Período	t _R ^a (min)	Analito	Transição de quantificação (m/z)	Transição de confirmação (m/z)
6	12,45	Ergocorninina	562,2 → 544,2	562,2 → 223,2
	12,47	Roquefortina C	390,2 → 193,2	390,2 → 322,3
	12,90	α-Ergocriptinina	576,4 → 558,4	576,4 → 223,3
	12,91	Fumonisina B ₁ (FB ₁)	722,5 → 334,4	722,5 → 352,3
	13,08	Toxina HT-2 (HT2)	442,2 → 263,1	447,4 → 345,1
	13,19	Ergocristinina	610,4 → 592,5	610,4 → 223,3
	13,20	Griseofulvina	353,2 → 165,2	353,2 → 215,2
	13,23	Citocalasina J	452,2 → 416,5	452,2 → 434,5
	13,46	Brefeldina A	281,0 → 245,5/	281,0 → 263,3
	15,46	Citocalasina C	525,2 → 430,5	525,2 → 490,5
	13,53	Fumonisina B ₃ (FB ₃)	706,3 → 336,3	706,3 → 318,5
7	13,67	Toxina T-2 (T2)	484,3 → 215,2	484,3 → 185,1
	13,72	Ácido micofenólico	338,1 → 207,2	338,1 → 303,2
	13,74	Verrucarina	520,2 → 249,1	520,2 → 457,1
	13,74	Citocalasina H	494,2 → 434,5	494,2 → 416,5
	13,74	Citocalasina B	480,2 → 462,5	480,2 → 444,5
	13,79	Fumitremorgina C	380,3 → 212,3	380,3 → 324,3
	13,81	Ocratoxina B (OTB)	370,1 → 205,0	370,1 → 103,2
	13,85	Roridina A	550,4 → 249,2	550,4 → 231,3
	13,97	Citocalasina D	525,2 → 430,5	525,2 → 490,5
	14,12	Fumonisina B ₂ (FB ₂)	706,3 → 336,3	706,3 → 318,5
8	14,12	Citocalasina E	513,3 → 416,4	513,3 → 434,5
	14,56	Citrinina (CTN)	251,0 → 233,0	251,0 → 205,2
	14,63	Cetomina	711,2 → 298,2	711,2 → 348,2
	14,65	Caetoglobosina A	529,4 → 130,2	529,4 → 511,3
	14,69	Ocratoxina A (OTA)	404,0 → 239,0	404,0 → 102,0
	14,89	Esterigmatocistina (SMC)	325,1 → 310,2	325,1 → 281,1
	14,91	Citocalasina A	478,2 → 460,5	478,2 → 120,2
	14,95	Verruculogeno	512,3 → 352,2	512,3 → 494,2
	15,62	Penitrem A	634,4 → 558,5	634,4 → 616,4
9	15,75	Eniatina B ₃ (EB ₃)	629,4 → 196,3	629,4 → 214,3
	15,80	Mevinolina	405,4 → 199,2	405,4 → 173,3
	15,80	Eniatina B (EB)	657,5 → 196,3	657,5 → 214,1
	15,91	Paxillina	436,4 → 182,2	436,4 → 167,2
	15,97	Eniatina B ₁ (EB ₁)	671,4 → 196,0	671,4 → 210,0
	16,03	Bovericina (BEA)	801,5 → 244,2	806,5 → 384,4
	16,04	Alameticina-F30	775,5 → 282,3	775,5 → 197,2
	16,12	Eniatina A ₁ (EA ₁)	685,4 → 210,1	685,4 → 228,2
	16,26	Eniatina A (EA)	699,4 → 210,1	699,4 → 228,0

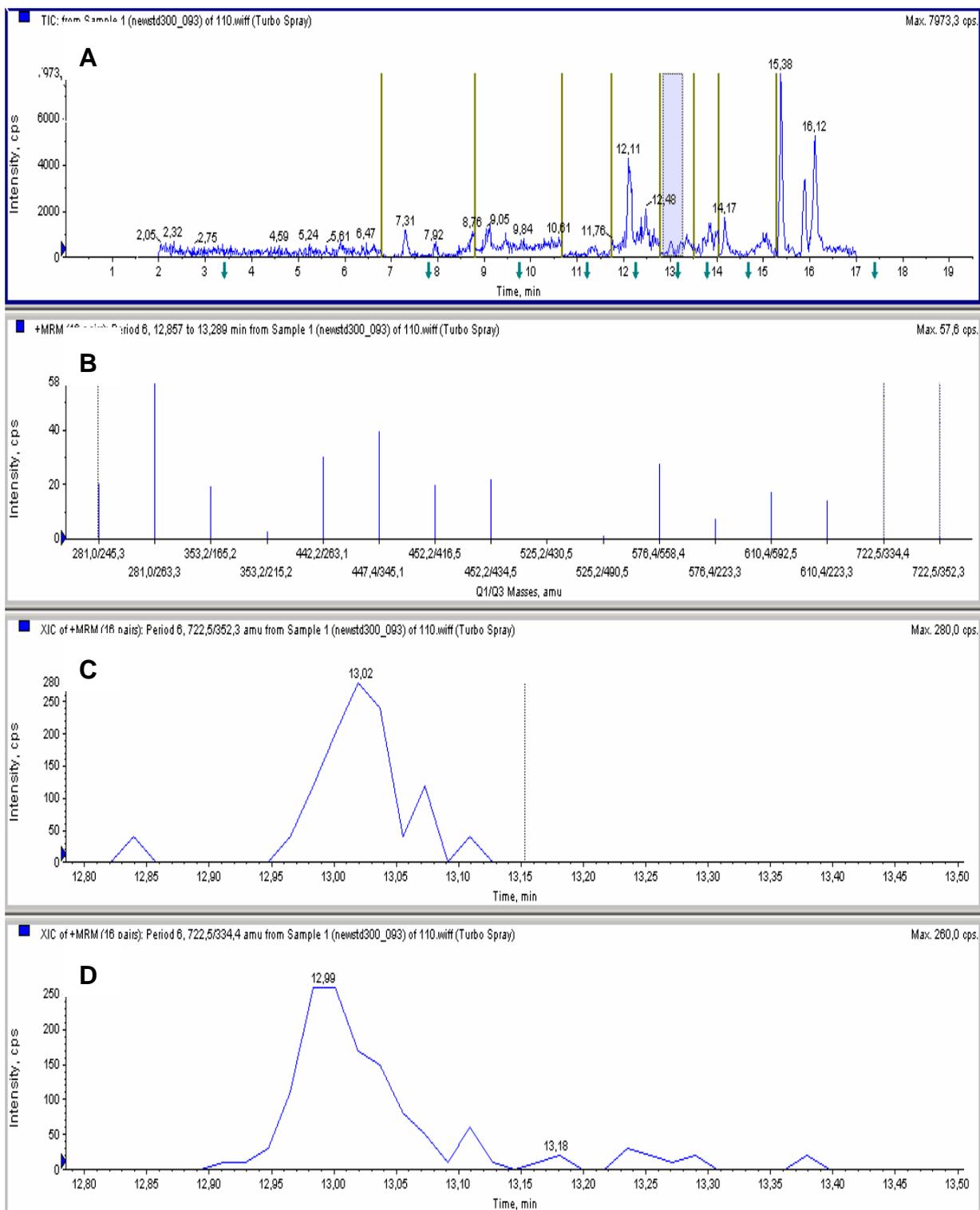
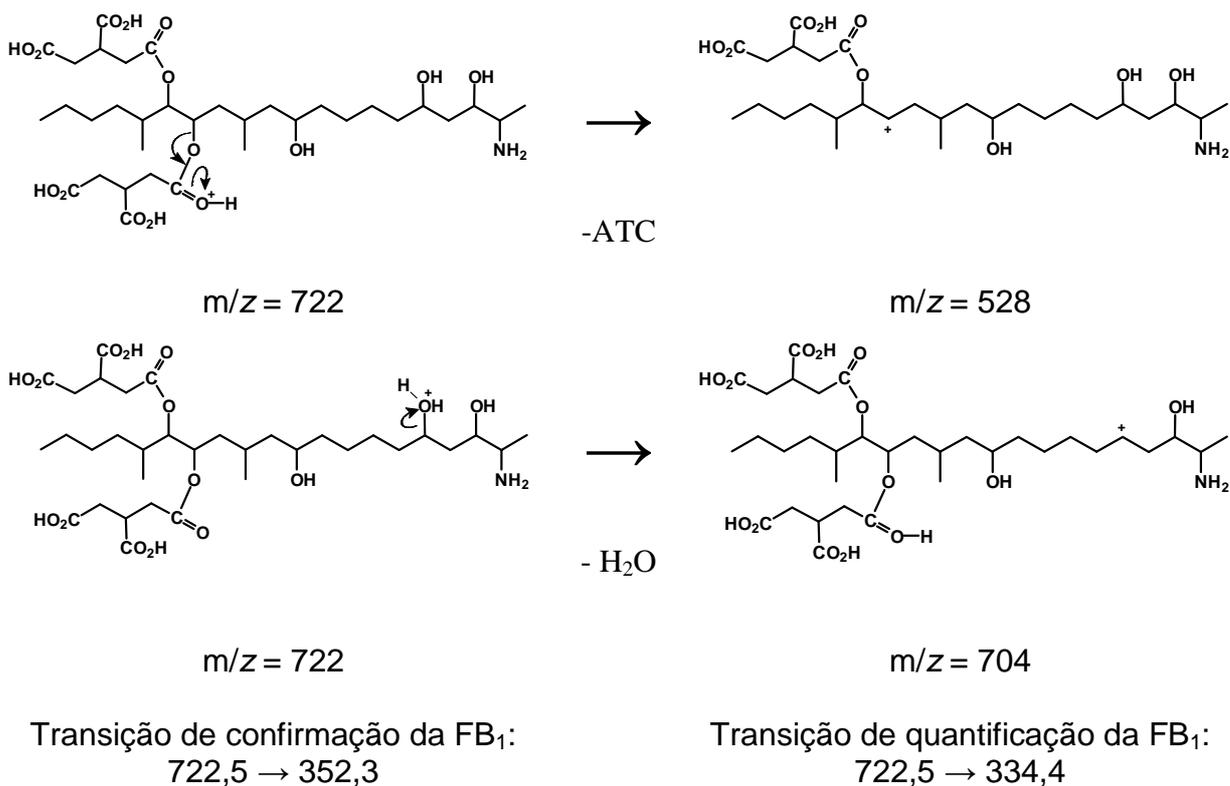


Figura 15: (A) Cromatograma de íons totais no modo positivo da mistura de padrões de 80 micotoxinas obtido por CLAE-EM/EM (ESI). (B) Espectro de massas referente ao período selecionado e os picos referentes às duas transições de FB1: (C) uma de quantificação (722,5→352,3) e (D) outra de confirmação (722,5→334,4).



Íons produtos (m/z)	FB ₁	FB ₂	FB ₃
[M + H-H ₂ O] ⁺	704	688	688
[M + H-2H ₂ O] ⁺	686	670	670
[M + H-TCA] ⁺	546	530	530
[M + H-H ₂ O-TCA] ⁺	528	512	512
[M + H-2TCA] ⁺	370	354	354
[M + H-2TCA-H ₂ O] ⁺	352	336	336

Figura 16: Esquema de fragmentação da FB₁.

Após a escolha das transições, as energias de ionização e de colisão são otimizadas para cada transição selecionada afim de se obter maior sensibilidade.

Como pode ser observado nos cromatogramas (Figuras 14 e 15), mesmo que ocorra uma coeluição de analitos estes podem ser identificados e distinguidos pelo espectro de massas tandem quando as respectivas transições forem diferentes.

5.1 AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DAS AMOSTRAS E DA QUANTIDADE IDEAL DE AMOSTRA A SER TOMADA PARA QUANTIFICAÇÃO

A amostragem e tomada da amostra para análise constituem fatores de erro na análise de micotoxinas. Conforme descrito no item 4.1.3, as amostras que chegaram ao laboratório foram moídas e homogeneizadas durante 15 min. em homogeneizador Chopin MR10L. A fim de avaliar a homogeneidade das subamostras e quantidade ideal de subamostra analítica a ser tomada para quantificação das toxinas por este método, três amostras de milho naturalmente contaminadas foram avaliadas em triplicata em quantidades diferentes de tomada de subamostra analítica: 1g, 5g e 25g (conforme descrito no item 4.2.1).

Seguiu-se o procedimento descrito na parte experimental (item 4.2.1) as amostras foram analisadas utilizando-se o sistema CLAE-EM/EM. As micotoxinas quantificadas nas amostras naturalmente contaminadas selecionadas para este experimento (M106, M15 e M18) foram FB1, FB2 e FB3. Outras micotoxinas foram detectadas, porém não foram quantificadas, entre elas HFB1, ácido cójico, AFB1, AFB2, AFG2, agroclavina, chanoclavina, bovericina, eniatina A, eniatina A1, eniatin B, no modo positivo e MON e no modo negativo.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados das médias da repetibilidade das triplicatas e do total das amostras, desvio padrão e os valores obtidos de desvio padrão relativo de repetibilidade (RSD_r) nas tomadas de amostra de 1g, 5g e 25g. A faixa aceitável de RSD_r para níveis acima de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de fumonisina é de 20% segundo regulamento da CE (REGULAMENTO (CE) N. 401/2006). Deste modo, os valores observados de RSD_r foram satisfatórios indicando que a metodologia empregada foi adequada, pois o desvio padrão relativo de repetibilidade (RSD_r) foi menor que 10%, tanto na mesma quantidade de tomada de subamostra quanto na média total das quantidades avaliadas. Estes resultados indicaram que, além das amostras estarem homogêneas, qualquer quantidade de subamostra analítica avaliado poderia ser tomado para análise quantitativa das micotoxinas nas amostras.

Tabela 8: Resultados das médias da repetibilidade, desvio padrão e padrão relativo de repetibilidade (RSD_r) para diferentes quantidades de tomada de amostra para quantificação de FB₁, FB₂ e FB₃ em amostras de milho naturalmente contaminado.

Micotoxina	Amostra	Quantidades tomadas	Média das repetições (µg/kg)	Desvio Padrão (µg/kg)	RSD _r (%)
FB1	M106	1g	909	70	7,67
		5g	867	35	4,00
		25g	838	64	7,60
		Média geral	871	59	6,8
	M15	1g	7723	361	4,68
		5g	8793	410	4,67
		25g	9453	322	3,41
		Média geral	8657	820	9,5
	M18	1g	740	14	1,84
		5g	789	15	1,92
		25g	794	9	1,08
		Média geral	774	28	3,6
FB2	M106	1g	409	28	6,87
		5g	395	26	6,68
		25g	366	33	8,93
		Média geral	244	6	2,5
	M15	1g	2443	127	5,21
		5g	2817	138	4,90
		25g	2767	21	0,75
		Média geral	2676	199	7,4
	M18	1g	242	9	3,53
		5g	247	5	2,02
		25g	241	7	2,76
		Média geral	244	6	2,5
FB3	M106	1g	99	6	6,26
		5g	93	2	2,09
		25g	88	4	4,24
		Média geral	94	6	6,3
	M15	1g	854	37	4,37
		5g	1030	26	2,57
		25g	1019	22	2,16
		Média geral	968	89	9,2
	M18	1g	97	5	4,65
		5g	101	4	3,79
		25g	101	4	3,85
		Média geral	100	4	4,1

5.2 TESTE DE RECUPERAÇÃO

O teste de recuperação foi realizado contaminando-se artificialmente 3 amostras de milho e 3 de ração em duplicata, conforme procedimento descrito no item 4.1.5. Para este teste quantidade de subamostra tomada para análise foi menor que a tomada para análise das amostras em geral, somente 0,5 g de cada amostra foram contaminados artificialmente com uma combinação de 11 soluções de trabalho contendo uma mistura de padrões. Este procedimento foi devido a disponibilidade e custo dos padrões e graças a sensibilidade da técnica de análise utilizada, pois o método por CLAE-EM/EM permite a análise a nível de ppb mesmo em pequenas quantidades de amostra. Os níveis de contaminação (NC) de cada micotoxina adicionada artificialmente nas amostras, assim como o limite de detecção do método e os resultados da recuperação (média \pm desvio padrão) das micotoxinas obtidos, estão apresentados na Tabela 9.

De um modo geral os valores obtidos para a recuperação foram satisfatórios, estando de acordo com os obtidos anteriormente por Sulyok (2007a e 2007b). Das 101 micotoxinas analisadas, 73 apresentaram recuperação entre 70 e 120% em milho, enquanto 65 micotoxinas apresentaram recuperação nesta faixa percentual em ração. A recuperação para as fumonisinas nas amostras de milho variaram entre $74 \pm 5\%$ e $98 \pm 5\%$, entretanto nas amostras de ração a recuperação foi baixa devido à extração incompleta. Para as aflatoxinas ocorreu o mesmo (baixa recuperação nas amostras de ração) principalmente devido ao efeito matriz. Entre os hexapeptídios, a bovericina e eniatina B apresentaram recuperação abaixo de 70%. Para os alcaloides de Ergot a recuperação foi muito baixa (entre 30 e 80%) devido à extração incompleta e epimerização em casos como ergopeptídios (note a diferença entre inas e ininas) e outros analitos polares.

Além disso, a recuperação para algumas micotoxinas foi inesperadamente abaixo de 70% (tal como gliotoxina, caetoglobosina A and citocalasina A), o que indica que quaisquer conclusões sobre uma determinada matriz ou analito não deve ser generalizada. Por exemplo, a recuperação nas amostras de ração foram ligeiramente inferiores em comparação com as amostras de milho para poucas micotoxinas (por exemplo, fumonisinas, aflatoxinas B2 e G2), embora a ração seja considerada uma matriz muito mais complexa. No entanto, deve ser ressaltado que os efeitos matriz têm de ser cuidadosamente reavaliados para cada analito se o método é transferido para uma nova matriz.

Tabela 9: Limite de detecção (LOD), nível de contaminação (NC) e recuperações das micotoxinas em milho e em ração.

x Toxina	NC µg/kg	LOD µg/kg	Recuperação x (%) [*]	
			Milho	Ração
Fumonisinias				
Fumonisina B ₁ (FB ₁)	504	8	78±5	51±3
Fumonisina B ₂ (FB ₂)	505	7	76±2	53±2
Fumonisina B ₃ (FB ₃)	50,0	4	98±5	74±7
Fumonisina B ₁ hidrolisada	54,9	17	74±5	75±4
Aflatoxinas				
Aflatoxina B ₁ (AFL B ₁)	25	0,8	71±5	77±3
Aflatoxina G ₁ (AFL G ₁)	25	0,5	80±3	75±6
Aflatoxina B ₂ (AFL B ₂)	25	0,7	83±2	65±7
Aflatoxina G ₂ (AFL G ₂)	25	1	87±2	69±9
Ocratoxinas				
Ocratoxina A (OTA)	20	1	82±5	94±3
Ocratoxina B (OTB)	20	1	85±5	93±5
Ocratoxina α (OTα)	11	3	77	84
Zearalenona e derivados				
Zearalenona (ZON)	100	0,4	86±3	81±3
Zearalenona-4-sulfato	0,4	0,3	86	95
α-Zearalenol (α-ZOL)	20	3	100±9	90±6
β-Zearalenol (β-ZOL)	20	4	75±7	69±7
Zearalenona-4-glicosídeo	20	5	94±19	112±5
α-Zearalenol-glicosídeo	120	0,8	94±11	99±8
β-Zearalenol-glicosídeo	120	1	110	99
Hexadepsipeptídios				
Bovericina (BEA)	10	2	66	86
Eniatina A (EA)	0,8	0,1	102±8	87±6
Eniatina A ₁ (EA ₁)	0,56	0,15	100±6	88±9
Eniatina B (EB)	0,53	0,3	66±6	67±13
Eniatina B ₁ (EB ₁)	1,51	0,2	100±3	73±2
Eniatina B ₃ (EB ₃)	0,63	0,04	93	87
Alcaloides do Ergot				
Agroclavina	3,4	0,2	49±7	60±16
Canoclavina	50	0,4	79±4	80±7
Festuclavina	50	0,15	83±2	70±6
Elimoclavina	50	1	47±4	47±11
Elimoclavina frutósido	50	4	29±4	32±8
Elimoclavina oxidado	50	3	46±3	51±9
Ergina	1,08	0,1	57±4	54±9
Ergotamina	1,08	0,7	24	37
Diidroergotamina	1,08	0,5	49	43
Ergocornina	1,08	1	36	30
Ergocorninina	0,692	0,15	52	62
Ergocristina	1,08	0,3	23	33
Ergocristinina	0,692	0,2	59	61
α-Ergocriptina	1,08	0,2	30	36
α-Ergocriptinina	0,692	0,1	67	69
Ergometrina	2,17	0,1	90	80
Ergometrinina	0,432	0,07	58±5	43±4
Ergosina	1,08	0,13	37	31
Ergosinina	0,692	0,02	82	48
Diidroergosina	2,17	1,2	52	33
Ergovalina	5,34	1	64	45
Luol oxidado	50	0,3	72	75
Lisergol	50	1	76±2	65±5
Metilsergide	0,70	0,4	75	83
Diidrolysergol	50	0,2	79±2	66±4

x Toxina	NC µg/kg	LOD µg/kg	Recuperação (%) [*]	
			Milho	Ração
Tricotecenos				
Desoxinivalenol (DON)	100	20	107±5	99±2
Desoxinivalenol-3-glicosídeo	20	15	120±11	75±7
3-Acetildesoxinivalenol	100	20	91±5	96±3
15-Acetildesoxinivalenol	50,4	50	104±7	116±18
Nivalenol (NIV)	100	50	110±16	90±3
Deepoxidesoxinivalenol	25,5	15	127	114
Fusarenona X (F-X)	101	50	100±8	101±5
Toxina HT-2 (HT2)	100	20	99±6	104±4
Toxina T-2 (T2)	100	20	101±2	98±2
Neosolaniol (NEO)	27,0	3	92±6	95±4
Monoacetoxiscirpenol	10	2	111±16	110±13
Diacetoxiscirpenol (DAS)	100	1	91±4	98±1
Verrucarol	200	180	80±17	95±8
Verrucarin A	10,7	5	95	91
Roridina A	13,7	1	89	87
T2-Tetraol	42,7	20	76	89
T2-Triol	42,7	20	79	77
Outras				
Moniliformina (MON)	203,5	81	87	112
Ácido Cójico,	3000	160	83±3	64±9
Emodina	8,5	4	89	65
Brefeldina A	62,5	60	95±12	93±7
Roquefortina C	62,5	4	65±5	61±9
Ácido gibberelico	85,4	20	102	101
Patulina (PAT)	64,2	100	16	22
Gliotoxina	42,7	12	58	12
Fumitremorgina C	6,4	4	90	79
Altenueno	8,5	6	89	102
Alternariol	17,1	2	91	82
Alternariolmonometileter	8,5	0,1	99	81
Esterigmatocistina (SMC)	8,5	0,4	78	84
Citrinina (CTN)	25,6	30	90	122
Citocalasina A	62,5	30	18±7	25±8
Citocalasina B	62,5	10	95±5	89±6
Citocalasina C	62,5	2	96±11	94±12
Citocalasina D	62,5	4	102±7	92±4
Citocalasina E	62,5	20	95±5	96±5
Citocalasina H	62,5	30	98±5	96±5
Citocalasina J	62,5	5	95±5	98±6
Mevinolina	42,7	7	109	65
Ácido micofenólico	23,9	10	106	103
Paxillina	42,7	25	99	66
Penitrem A	12,8	5	133	121
Sulocrina	21,3	4	84	83
Tentoxina	3,39	0,5	148	152
Caetoglobosina A	21,3	9	10	50
Cetomina	64,0	100	18	17
Meleagrín	21,3	2	92	99
Verruculogeno	24,4	50	78	86
Griseofulvina	21,3	10	90	90
Alameticina-F30	40	3	99	85
Toxina AAL TA			84±6	57±7
Toxina HC	43,5	20	87±5	68±4

* A média e o desvio padrão foram determinados para cada analito analisando três amostras em duplicata e em cada matriz contaminada artificialmente.

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ

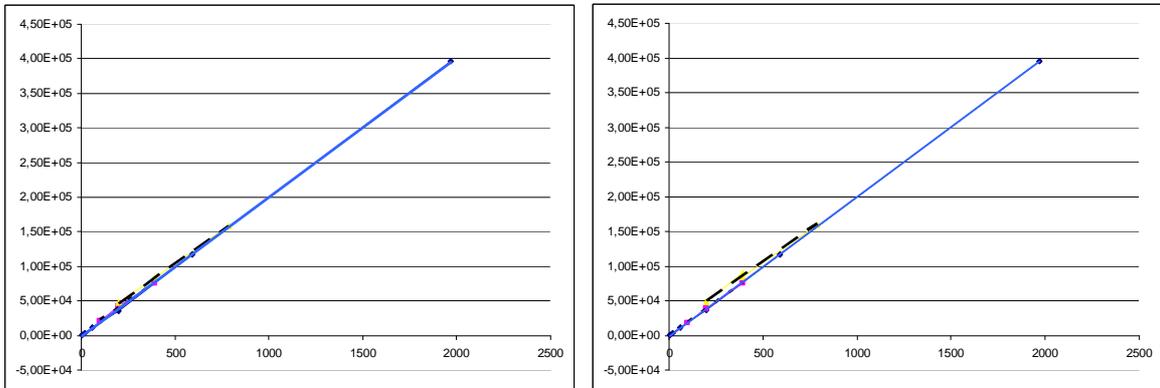
Análises quantitativas de extratos brutos por CLAE/EM/EM podem ser prejudicadas pela supressão de sinal devido ao efeito matriz, por isso a necessidade de avaliar este parâmetro para validar o método.

Para a avaliação do efeito matriz uma amostra de milho e outra de ração foram contaminadas artificialmente com uma mistura de padrões das 101 micotoxinas em três níveis diferentes (NC), assim como o extrato destas amostras em níveis equivalentes (Tabela 10). O nível intermediário foi feito em duplicata. Foram calculados a regressão linear e o desvio angular das três curvas obtidas: do padrão, das amostras artificialmente contaminadas e dos extratos artificialmente contaminados conforme descritos na parte experimental (item 4.2.2).

A Figura17 compara as três curvas obtidas para a avaliação do efeito matriz da FB₁ em milho e em ração. Não foi observado efeito matriz para as fumonisinas, a recuperação aparente foi melhor que a recuperação calculada anteriormente, resultando em uma boa eficiência de extração para estas toxinas. O mesmo foi observado para as ocratoxinas. Para a zearalenona e seus derivados só foram observados efeitos da matriz nos derivados glicosilados, onde o desvio angular da curva do extrato contaminado foi maior que o desvio angular da curva do padrão (maiores que 120%). Para os hexapeptídios o efeito da matriz foi relevante para a amostra de ração (menores que 75%) mas não para milho.

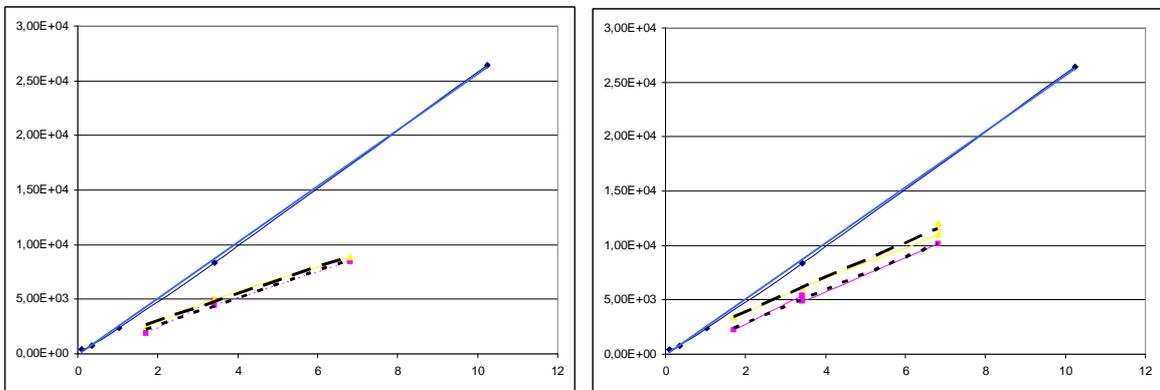
A Figura18 compara as três curvas obtidas para a avaliação do efeito matriz da AFB₁ em milho e em ração. O efeito da matriz para as aflatoxinas foi relevante (<70% ou >120%) resultando em baixa recuperação aparente, pois o desvio angular da curva do extrato contaminado foi menor que o desvio angular da curva do padrão. Logo, para a correta análise quantitativa destas toxinas, faz-se necessário a utilização de curva padrão preparada com o extrato da amostra a fim de reduzir o efeito da matriz.

Para a maioria dos alcaloides de ergot foi observado o efeito da matriz, especialmente entre os que possuem epímeros (note a diferença entre inas e ininas na Tabela 10). Entre os tricotecenos este efeito foi relevante apenas para desoxinivalenol-3-glicosídeo em milho, 3-acetildesoxinivalenol e verrucarol em ração. Outras micotoxinas também apresentaram efeito da matriz (<70% ou >120%), porém, como não foi detectada a presença destas toxinas nas amostras avaliadas não se faz necessário uma quantificação mais precisa destas toxinas.



	A	B
—	Milho	Ração
—	curva padrão no solvente	$y = 201,74x - 1239,4$
- - -	curva padrão na amostra artificialmente contaminada	$y = 189,9x + 9350$
.....	curva padrão no extrato artificialmente contaminado	$y = 184x + 4736,8$
		$y = 195,4x - 510,53$

Figura 17: Comparação das três curvas obtidas para a avaliação do efeito da matriz na análise de FB_1 em milho (A) e em ração (B).



	A	B
—	Milho	Ração
—	curva padrão no solvente	$y = 2577,9x - 124,07$
- - -	curva padrão na amostra artificialmente contaminada	$y = 1227,5x + 576,71$
.....	curva padrão no extrato artificialmente contaminado	$y = 1243,1x + 121,58$
		$y = 1580,6x + 707,03$
		$y = 1520,5x - 214,21$

Figura 18: Comparação das três curvas obtidas para a avaliação do efeito da matriz na análise de AFB_1 em milho (A) e em ração (B).

Tabela 10: Resultados obtidos do cálculo do efeito matriz, recuperação aparente e eficiência de extração nos três níveis de contaminação (NC) avaliados.

x Toxina	NC1	NC2	NC3	Efeito Matriz (%)		Recuperação Aparente (%)		Eficiência de Extração (%)	
	µg/kg	µg/kg	µg/kg	Milho	Ração	Milho	Ração	Milho	Ração
Fumonisinás									
Fumonisiná B ₁ (FB ₁)	98	197	393	93,4	92,3	90,5	96,1	96,9	104
Fumonisiná B ₂ (FB ₂)	99	197	394	93,7	90,9	90,9	85,0	97,0	93,5
Fumonisiná B ₃ (FB ₃)	32	63	127	94,9	85,4	89,9	87,9	94,7	103
Fumonisiná B ₁ hidrolisada (HFB ₁)	53,6	107	214	91,1	88,8	94,3	97,4	103	110
Aflatoxinas									
Aflatoxina B ₁ (AFL B ₁)	1,71	3,41	6,93	50,4	59,0	47,2	57,8	93,7	97,9
Aflatoxina G ₁ (AFL G ₁)	1,74	3,48	6,96	89,7	115	94,7	56,3	106	48,9
Aflatoxina B ₂ (AFL B ₂)	0,43	0,85	1,7	61,5	54,2	66,2	55,0	108	102
Aflatoxina G ₂ (AFL G ₂)	0,43	0,85	1,7	69,5	47,2	79,4	58,9	114	125
Ocratoxinas									
Ocratoxina A (OTA)	5,3	10,6	21,3	80,9	84,1	76,7	85,1	94,9	101
Ocratoxina B (OTB)	5,3	10,6	21,3	95,8	95,6	102	80,6	108	84,3
Ocratoxina α (OTα)	5,5	11	22	80,7	78,9	70,8	82,8	87,7	105
Zearalenona e derivados									
Zearalenona (ZON)	21,8	43,5	87	79,6	78,5	84,0	87,4	106	111
Zearalenona-4-sulfato (ZON4S)	0,26	0,51	1,02	75,4	84,6	69,8	92,1	92,6	109
α-Zearalenol (α-ZOL)	5,3	10,7	21,3	102	100	109	119	107	119
β-Zearalenol (β-ZOL)	5,3	10,7	21,3	88,2	78,8	90,8	88,7	103	113
Zearalenona-4-glicosídeo (ZON4G)	17	34	68	122	139	166	174	136	125
α-Zearalenol-glicosídeo (α-ZOLG)	5,3	10,7	21,3	142	162	185	173	131	107
β-Zearalenol-glicosídeo (β-ZOLG)	5,3	10,7	21,3	144	136	220	175	153	129
Hexadepsipeptídios									
Bovericina (BEA)	2,44	4,88	9,77	90,7	74,3	94,9	83,4	105	112
Eniatina A (EA)	0,149	0,30	0,60	88,8	63,3	108	84,1	122	133
Eniatina A ₁ (EA ₁)	0,922	1,84	3,7	94,8	65,1	101	71,3	106	110
Eniatina B (EB)	0,972	1,94	3,90	93,3	71,2	98,7	69,8	106	98,1
Eniatina B ₁ (EB ₁)	2,62	5,24	10,5	75,2	69,6	89,6	72,0	119	103
Eniatina B ₃ (EB ₃)	2,44	4,88	9,77	90,3	89,2	101	101	112	113
Alcaloides do Ergot									
Agroclavina	1,7	3,4	6,8	85,1	81,8	90,2	94,7	106	116
Canoclavina	1,7	3,4	6,8	76,9	75,9	74,2	81,8	96,4	108
Festuclavina	1,7	3,4	6,8	84,1	83,8	86,3	86,9	103	104
Elimoclavina	1,4	2,9	5,8	90,3	84,1	85,5	91,3	94,7	109
Elimoclavina frutósídeo	1,8	3,6	7,2	97,1	154	102	68,2	105	44,3
Elimoclavina oxidado	1,7	3,4	6,83	104	130	104	117	100	90,2
Ergina	0,54	1,08	2,17	84,3	103	73,6	123	87,3	119
Ergotamina	0,54	1,08	2,17	36,0	31,1	38,6	37,9	107	122
Ergocornina	0,54	1,08	2,17	41,5	26,8	27,6	26,8	66,6	99,9
Ergocorninina	0,35	0,69	1,38	40,4	52,9	56,8	58,2	141	110
Ergocristina	0,54	1,08	2,17	18,4	22,9	22,0	32,7	120	143
Ergocristinina	0,35	0,70	1,38	45,3	58,1	45,3	66,9	100	115
α-Ergocriptina	0,54	1,08	2,17	35,9	33,4	30,5	21,5	84,9	64,3
α-Ergocriptinina	0,35	0,70	1,38	43,8	54,7	65,0	70,8	148	129
Ergometrina	1,1	2,2	4,3	83,2	80,8	81,2	83,5	97,6	103
Ergometrinina	0,22	0,43	0,86	42,0	66,8	74,8	91,7	178	137
Ergosina	0,54	1,08	2,17	33,5	29,4	32,1	27,9	95,7	94,8
Ergosinina	0,35	0,70	1,38	58,5	64,1	63,0	42,7	108	66,5
Dihidroergosina	0,11	0,22	0,43	64,8	48,5	44,7	32,5	69,0	66,9
Dihidroergotamina	0,54	1,08	2,17	42,8	40,9	44,1	30,5	103	74,6
Luol oxidado	1,7	3,4	6,8	101	110	95,1	111	94,1	101
Dihydrolysergol	1,7	3,4	6,8	94,7	85,9	137	93,9	145	109
Lisergol	1,7	3,4	6,8	89,6	82,2	86,5	94,8	96,5	115
Metilsergide	0,35	0,69	1,38	73,2	72,2	76,5	73,6	105	102
Ergovalina	0,54	1,08	2,17	72,0	87,0	91,8	69,9	128	80,3

Tabela 10: Resultados obtidos do cálculo do efeito matriz, recuperação aparente e eficiência de extração (continuação).

x Toxina	NC1	NC2	NC3	Efeito Matriz (%)		Recuperação Aparente (%)		Eficiência de Extração (%)	
	µg/kg	µg/kg	µg/kg	Milho	Ração	Milho	Ração	Milho	Ração
Tricotecenos									
Desoxinivalenol (DON)	21	43	85	92,8	89,5	98,0	98,8	106	110
Desoxinivalenol-3-glicosídeo	5,3	10,6	21,3	147	116	228	197	155	170
3-Acetildesoxinivalenol (3AcDON)	21,6	43,1	86,2	104	79,0	87,6	77,2	84,3	133
15-Acetildesoxinivalenol	13,4	26,9	53,78	93,5	101	93,7	96,4	100	95,5
Nivalenol (NIV)	21,6	43	86	101	91,9	81,2	105	80,4	114
Deepoxidesoxinivalenol (DOM-1)	6,8	13,6	27,2	104	88,1	119	119	114	136
Fusarenona X (F-X)	21,8	43,5	87,1	112	101	109	114	97,5	113
Toxina HT-2 (HT2)	21,8	43,5	87,1	70,7	82,2	95,3	90,2	145	110
Toxina T-2 (T2)	21,6	43,1	86,2	91,2	82,0	94,1	93,5	103	114
Neosolaniol (NEO)	13,5	27,0	54,0	88,9	90,8	101	87,5	114	96,3
Monoacetoxiscirpenol (MAS)	2,67	5,34	10,6	85,4	73,8	84,7	96,5	99,2	131
Diacetoxiscirpenol (DAS)	21,8	43,5	87,1	80,6	75,6	88,7	84,4	110	112
Verrucarol	10,7	21,3	42,7	82,2	68,5	65,9	92,8	80,2	135
Verrucarín A	5,3	10,6	21,3	94,2	85,5	107	95,1	113	111
Roridina A	6,8	13,7	27,3	84,8	72,8	88,8	86,5	105	119
T2-Tetraol	21,3	42,7	85,4	93,1	76,0	104	94,7	111	125
T2-Triol	21,3	42,7	85,4	76	73,5	123	105	162	142
Outras									
Moniliformina (MON)	97	195	389	74,5	79,3	111	150	149	190
Ácido Cójico.	64	128	256	94,8	90,4	99,6	87,0	105	96,2
Emodina	4,3	8,5	17	76,0	62,1	82,0	71,1	108	115
Brefeldina A	12,2	24,4	48,8	78,9	75,0	111	79,8	141	106
Roquefortina C	12,2	24,4	48,8	68,5	70,9	68,6	79,9	100	113
Ácido gibberellico	42,7	85,4	171	94,7	101	97,8	77,6	103	76,9
Patulina (PAT)	32	64	128	104	85,0	6,9	8,9	6,7	105
Gliotoxina	21,3	42,6	85,4	83,1	95,7	79,5	13,3	95,7	139
Fumitremorgina C	3,2	6,4	12,8	89,0	78,0	90,9	81,8	102	105
Altenueno	4,3	8,5	17,1	76,5	78,5	75,1	107	98,2	136
Alternariol	8,5	17	34	87,8	91,0	104	89,8	118	98,7
Alternariolmonometiléter	4,3	8,5	17,1	91,0	76,8	106	85,0	117	111
Esterigmatocistina (SMC)	4,3	8,5	17,1	78,2	82,5	61,4	89,6	78,6	109
Citrinina (CTN)	13	26	51	130	147	102	132	78,6	89,9
Citocalasina A	12,2	24,4	48,8	65,2	77,3	9,2	13,6	14,2	17,6
Citocalasina B	12,2	24,4	48,8	78,2	88,1	78,3	90,8	100	103
Citocalasina C	12,2	24,4	48,8	100	85,1	98,7	79,9	98,7	93,9
Citocalasina D	12,2	24,4	48,8	100	90,9	97,0	100	97,0	110
Citocalasina E	5,3	10,6	21,7	81,2	67,8	75,7	63,2	93,2	93,2
Citocalasina H	12,2	24,4	48,8	82,1	89,7	74,2	104	90,4	116
Citocalasina J	12,2	24,4	48,8	78,6	84,1	75,9	90,6	96,5	108
Mevinolina	21	42	85	77,8	49,9	86,3	63,0	111	126
Ácido micofenólico	12	24	48	99,3	82,3	94,3	94,3	95,0	115
Paxillina	21	42	85	99,4	56,5	92,4	52,0	92,9	92,1
Penitrem A	6,4	12,8	25,6	101	93,5	92,3	102	91,4	110
Sulocrin	10,7	21,3	42,6	75,5	76,7	95,6	81,3	127	106
Tentoxina	1,7	3,4	6,7	102	111	152	126	149	114
Caetoglobosina A	10,7	21,3	42,6	73,6	80,0	17,4	47,2	23,6	59,0
Cetomina	32	64	128	85,7	74,7	21,4	20,2	25,0	27,1
Meleagrín	10,7	21,3	42,7	78,6	79,0	82,9	91,6	105	116
Verruculogeno	12,2	24,4	48,8	138	155	113	125	82,0	80,6
Griseofulvina	10,7	21,3	42,7	81,0	83,1	86,2	93,2	106	112
Alameticina-F30	4,3	8,5	17,1	95,9	70,8	103	80,8	107	114
Toxina AAL TA	12,2	24,4	48,8	86,2	84,4	97,6	93,7	113	111
Toxina HC	21,8	43,5	87,1	47,6	31,8	66,6	47,3	140	149

5.4 CONTAMINAÇÃO COM MICOTOXINAS DAS AMOSTRAS AVALIADAS

As 38 amostras de milho coletadas na recepção da fábrica assim como as 36 amostras de ração para frango foram analisadas por CLAE-EM/EM (conforme descrito na Parte Experimental itens 4.1.2a, 4.1.2b 4.1.3 e 4.1.4) a fim de se avaliar a contaminação por micotoxinas. As Figuras de 16 a 19 representam os cromatogramas de íons totais nos modos positivos e negativos de uma amostra de milho e ração naturalmente contaminada. Na Tabela 11 encontram-se os resultados da contaminação de cada micotoxina encontrada nas amostras avaliadas: a faixa de contaminação, a média, o desvio padrão, a mediana e o número de amostras contaminadas. Como, em alguns casos, o desvio padrão era maior que a média, indicando que a dispersão das amostras é muito grande, a mediana foi incluída na tabela pois esta representa o valor onde se encontra 50% das amostras.

Todas as amostras de milho e ração estavam contaminadas com FB₁, FB₂ e FB₃. As médias dos níveis de contaminação das amostras de ração foram menores do que em amostras de milho, devido ao tratamento de peleização ou a adição de outros ingredientes além de milho. Conforme relatado por SORIANO e DRAGACCI (2004), SILVA *et al.* (2007), assim como RODRIGUEZ-AMAYA e SABINO (2002) em seus comentários sobre micotoxinas, a distribuição de fumonisinas é generalizada. Comparado com outros grãos, a contaminação por fumonisina em milho não é apenas mais frequente, como também apresenta esta toxina em maiores concentrações. As concentrações de FB₁ sempre excederam as concentrações de FB₂ e FB₃, seguindo o padrão geral de contaminação das fumonisinas no milho e alimentos à base de milho (SOLOVEY *et al.*, 1999, SILVA *et al.* 2007).

No presente estudo, as concentrações de FB₁ variaram entre 32,0 e 6000,0 µg/kg no milho, com uma média foi de 1156 ± 1127 µg/kg, ao passo que esta média de 285 ± 291 µg/kg em amostras de ração para aves. Para FB₂ e FB₃ as concentrações variaram entre 9,0 a 2450 µg/kg e 7,0 a 820 µg/kg, respectivamente. Embora a média do total de fumonisinas (FB₁+FB₂) em amostras de milho encontradas no presente estudo (1670 ± 1650 µg/kg) seja inferior ao limite máximo de fumonisinas (FB₁+FB₂) recentemente estabelecido pela Comunidade Europeia (COMISSÃO REGULADORA N^o 1881/2006) para milho não processado (4000 µg/kg), 4 amostras de milho analisadas (10,5%) ultrapassaram este limite, atingindo 8.780 µg/kg.

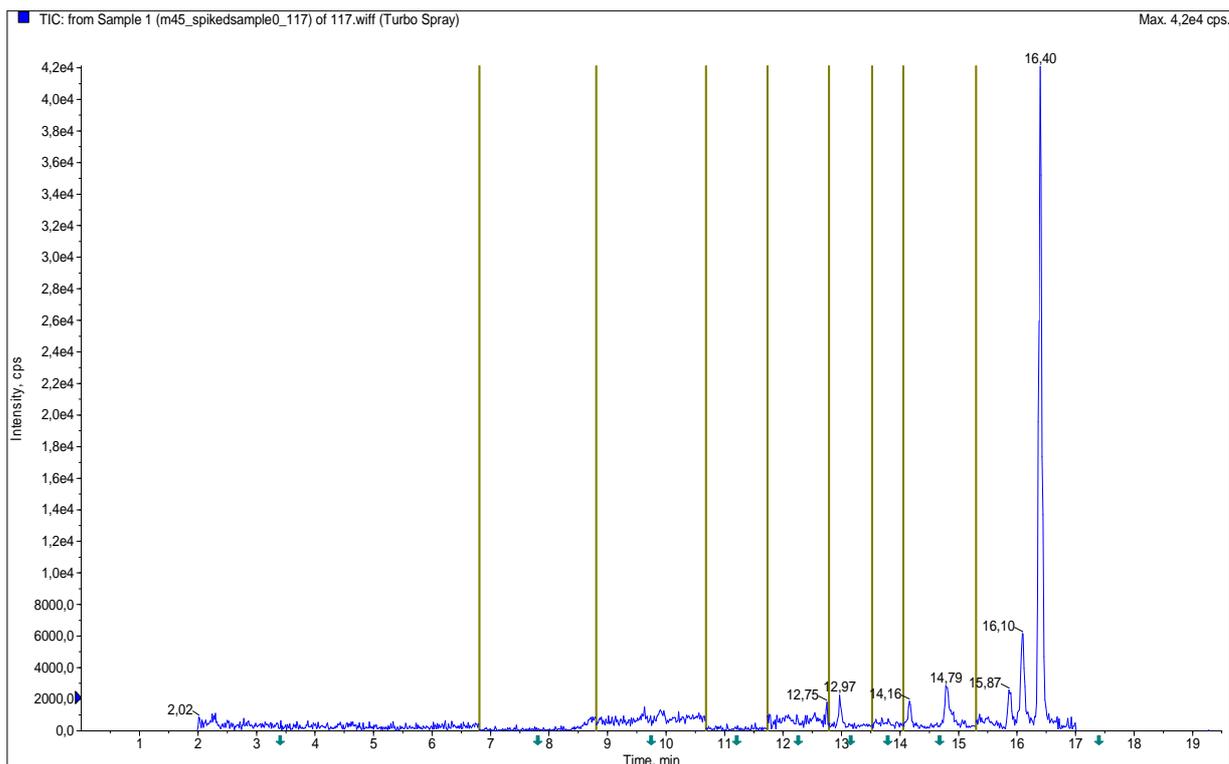


Figura 19: Cromatograma de íons totais no modo positivo da amostra de milho obtido por CLAE-EM/EM (ESI).

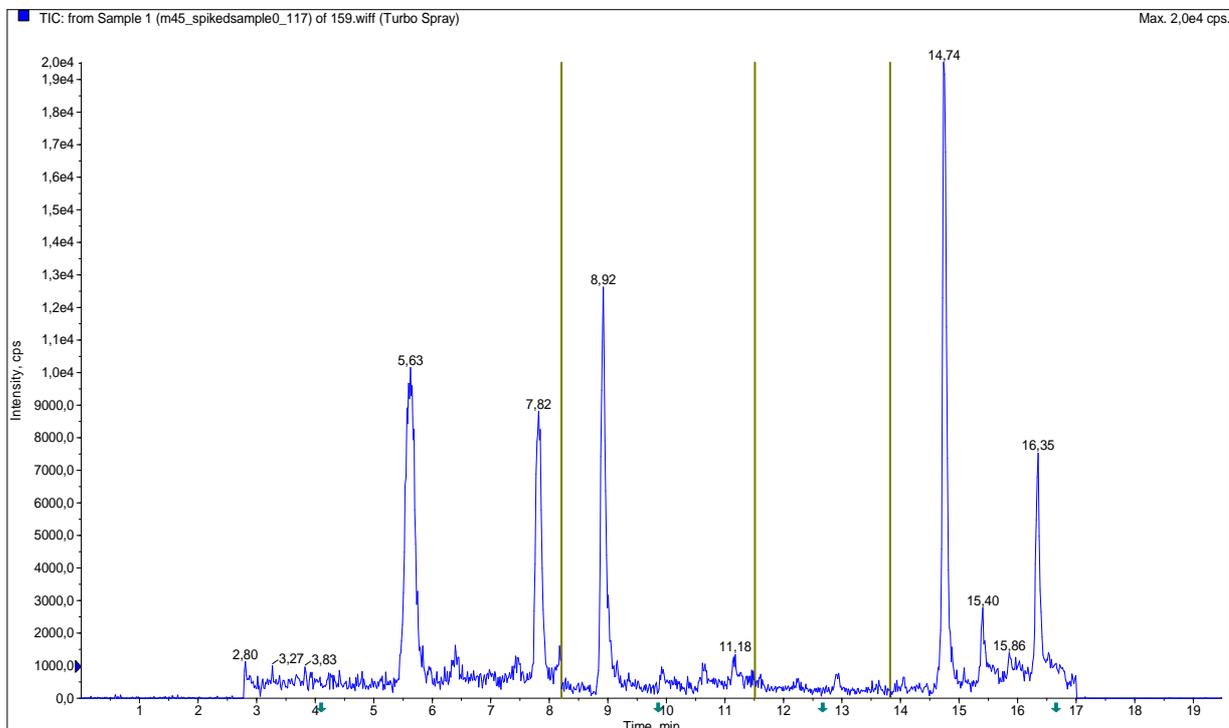


Figura 20: Cromatograma de íons totais no modo negativo da amostra de milho obtido por CLAE-EM/EM (ESI).

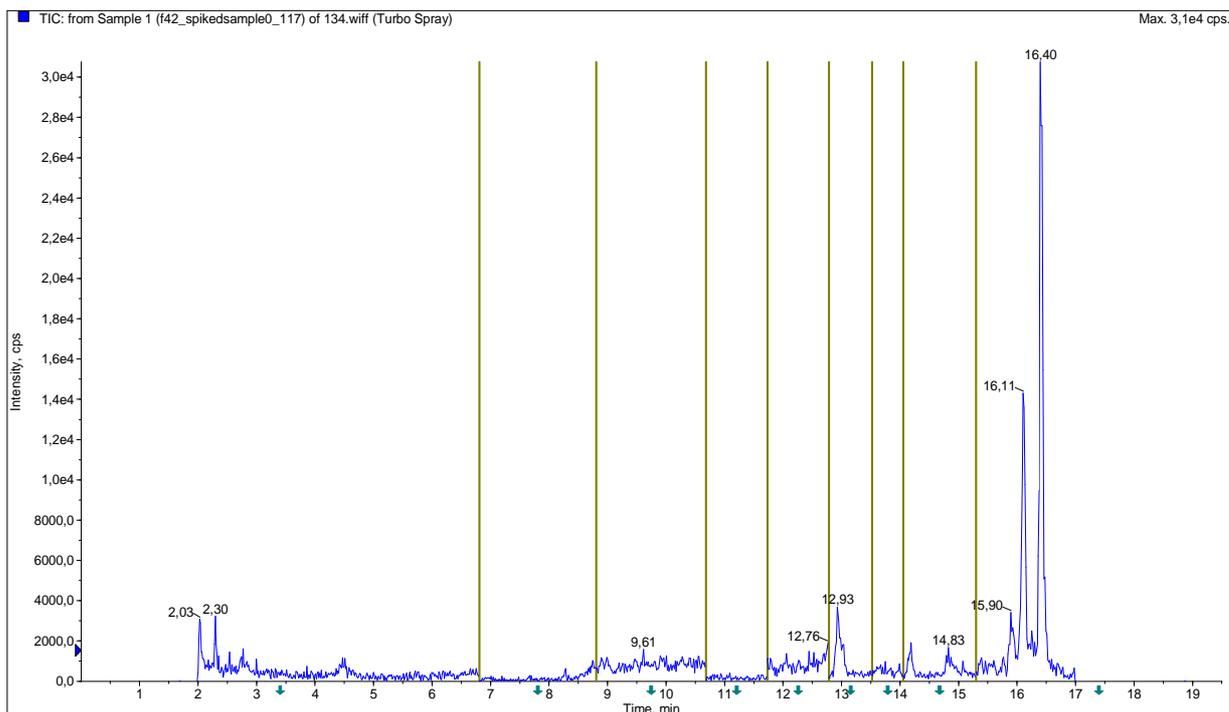


Figura 21: Cromatograma de íons totais no modo positivo da amostra de ração obtido por CLAE-EM/EM (ESI).

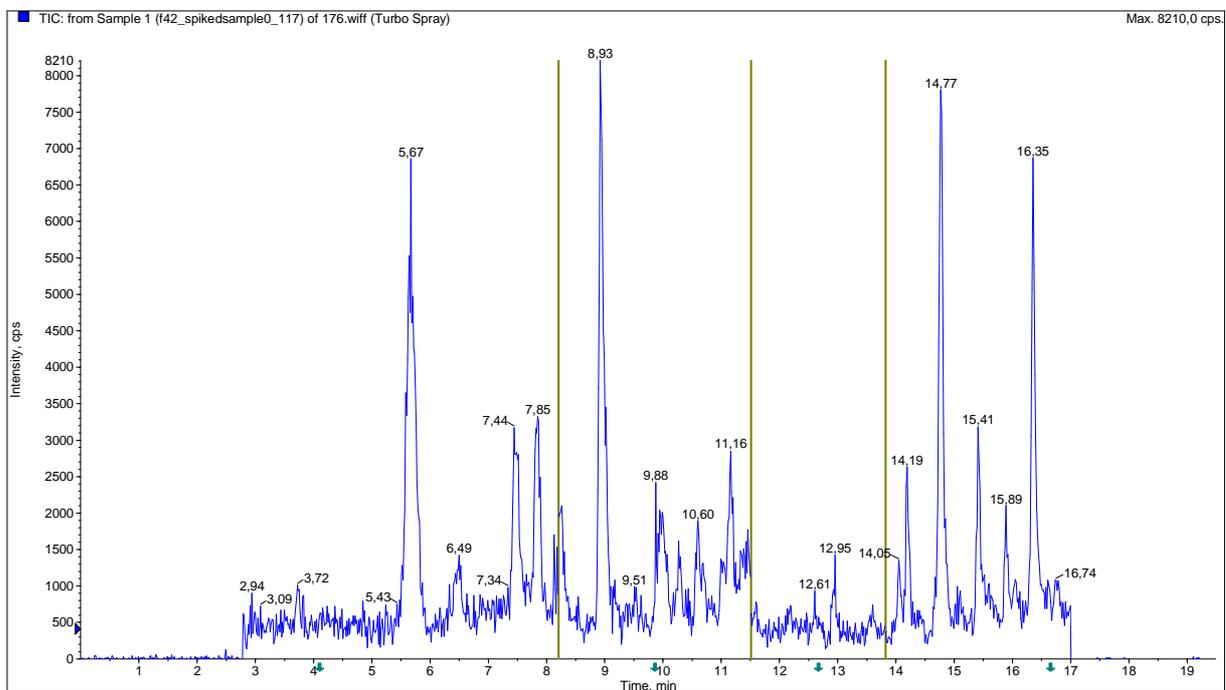


Figura 22: Cromatograma de íons totais no modo negativo da amostra de ração obtido por CLAE-EM/EM (ESI).

Além disso, fumonisina B₁ completamente hidrolisada (HFB₁), também denominada como aminopentol (AP₁), foi encontrada em 4 (10,5%) das amostras de milho. Embora várias fumonisinas tenham sido caracterizadas, a FB₁ é geralmente a mais abundante em alimentos contaminados, excepto quando o milho é tratado como para a produção de farinha de milho para tortilhas, onde a FB₁ hidrolisa a AP₁. O AP₁ também parece ter as mesmas atividades promotoras de câncer hepático que a FB₁. Os efeitos do AP₁ são contraditórios porque, a princípio, AP₁ é menos potente do que a FB₁ como um inibidor da ceramida sintase in vitro, no entanto, a AP₁ é convertida para um metabólito ainda mais potente (HUMPF *et al.*, 1998). Os resultados obtidos nesta pesquisa com relação a frequência e faixa de contaminações de FB₁ e FB₂ em milho são comparáveis com os dados relatados por estudos realizados em outros países. SYDENHAM *et al.* (1991) relataram uma incidência de fumonisinas em vários produtos a base de milho. Verificaram que a média entre as amostras positivas de FB₁ foi de 1048 µg/kg em fubá de milho nos E.U.A., 138 µg/kg na África do Sul, enquanto contaminações com FB₁ em milho atingiu 1655 µg/kg em Gana e 6600 µg/kg na Argentina e de Honduras. O mesmo ocorreu no Brasil, quando foi observado que todas as amostras de farinha de milho do Estado de São Paulo foram positivas para FB₁ e FB₂, com valores médios de 2100 e 700 µg/kg, respectivamente (BITTENCOURT *et al.*, 2005). HIROOKA *et al.* (1996) investigaram grandes regiões produtoras de milho no Brasil e também encontraram níveis altos de fumonisinas. Quase todas as amostras foram positivas para FBs. No que diz respeito à ocorrência FB₁, apenas 16,7% das amostras apresentaram contaminação em nível inferior a 2500 µg/kg, enquanto que na maioria das amostras (66,8%), a faixa de concentração de FB₁ variou entre 2501 e 7500 µg/kg e 16,7% das amostras analisadas apresentaram concentração de FB₁ superior a 7.500 µg/kg. Em contraste, existem poucos dados sobre a contaminação de ração. A média da contaminação por fumonisinas totais (FB₁+FB₂) foi de 387,1 ± 42,5 µg/kg atingindo o máximo de 1578,1 µg/kg. Os resultados observados nesta pesquisa, no que se refere a contaminação com fumonisinas, sugerem a urgente necessidade de uma regulamentação para fumonisinas no Brasil em milho ou em milho e ração.

Considerando os limites máximos estabelecidos no Brasil, ou mesmo pela CE para as aflatoxinas, estas toxinas foram detectadas em níveis muito baixos e em apenas quatro amostras (10%). O valor máximo encontrado para AFB₁ no milho foi de 2,30 µg/kg e média foi 0,52 ± 0,38 µg/kg. AFB₂ foi encontrada apenas em uma amostra de milho (1,80 µg/kg) e em cinco amostras de ração com média de 0,61 ± 0,28 µg/kg. A legislação brasileira

estabelece limites máximos apenas para aflatoxinas totais ($B_1+B_2+G_1+G_2$), sendo o limite máximo permitido para milho e produtos de milho de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para ingredientes de ração animal (BRASIL, 1988, 1996 e 2002), enquanto a CE estabelece limites máximos de AFB_1 em milho não processado de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e para AFLs totais de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (COMISSÃO REGULADORA N° 1881/2006). Como pode ser observado em trabalhos brasileiros sobre milho e alimentos à base de milho, a incidência de aflatoxina foi baixa e os níveis mais elevados de contaminação foram encontrados no Nordeste (RODRIGUEZ-AMAYA e SABINO, 2002; SALAY e MERCADANTE, 2002).

Os tricotecenos DON e NIV também foram detectados, porém em apenas 2,6% e 10,5% das amostras e em concentrações abaixo de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 116 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, considerando-se os limites estabelecidos pela EC em milho de 1750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para DON e 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para NIV. BISELLI e HUMMERT (2005) analisaram DON e toxinas de T-2 em milho e acharam uma média de 140 e 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e nível máximo de 1950 e 8,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

Com relação a outras toxinas de *Fusarium*, a concentração média observada de zearalenona (ZON) foi de 9,80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, assim não excedeu a norma (COMISSÃO REGULADORA N° 1881/2006) que fixa a concentração máxima para esta micotoxina de 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para ração. Seis amostras de milho (15,8%) estavam contaminadas com moniliformina, a concentração máxima foi de 171,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. MILANEZ *et al.* (2006) encontraram uma entre seis amostras de milho contaminada com toxinas HT2 e T2 nas concentrações de 555 e 767 ng/g, respectivamente; NIV e DON foram detectadas em somente uma amostra de fubá pré-cozido entre as 11 amostras analisadas em valores baixo de LOD (166 ng/g para NIV e 167 ng/g para DON) e DAS não foi detectada em nenhuma amostra.

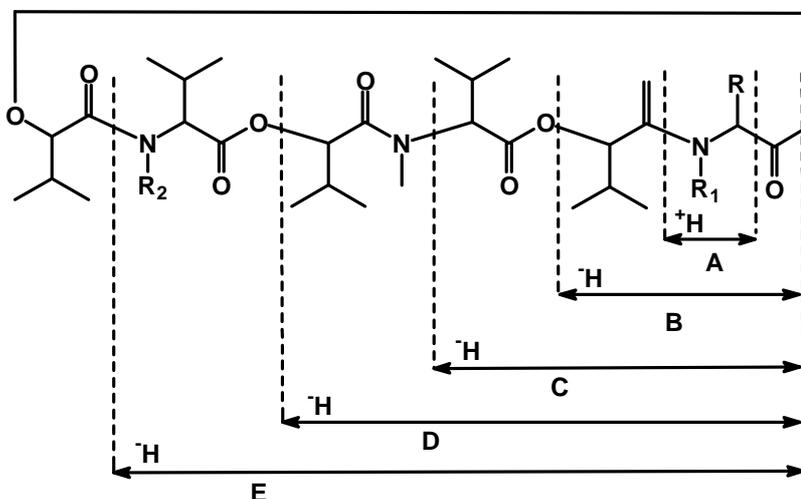
Entre as micotoxinas com maior frequência nas amostras avaliadas também observou-se bovericina (BEA) que foi encontrada em 34 amostras de milho (89,5%) com uma média de $22,3 \pm 29,1$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ e um máximo de 158 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e em 33 amostras de ração (91,7%) em concentrações que variaram do menor nível encontrado a 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (média de $4,55 \pm 3,52$ $\mu\text{g}/\text{kg}$). As concentrações das eniatinas nas amostras de milho alcançaram 0,13 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,23 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 4,95 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 1,25 g/kg para eniatina A, A1, B e B1, respectivamente. Este é o primeiro estudo que detecta hexadepsipeptídio em milho brasileiro. UHLIG *et al.* (2006) identificaram este grupo de substâncias como um dos mais citotóxicos em células de PK-15 obidos de extratos de *F. avenaceum* em cultura de arroz.

Tabela 11: Resultados da contaminação de micotoxinas nas amostras de milho e de ração de aves: faixa de contaminação, média e número de amostras contaminadas (percentual entre parêntesis).

Toxinas	MILHO				RAÇÃO			
	Faixa de contaminação (µg/kg) ^a	Média e desvio padrão (µg/kg) ^b	Mediana (µg/kg) ^b	Numero de amostras positivas (%)	Faixa de contaminação (µg/kg) ^a	Média e desvio padrão (µg/kg) ^b	Mediana (µg/kg) ^b	Numero de amostras positivas (%)
Fumonisinias								
Fumonisinina B ₁ (FB ₁)	31,8 – 6018,0	1156 ± 1127	946	38 (100)	49,8 – 1117,2	285,2 ± 291,4	185	36 (100)
Fumonisinina B ₂ (FB ₂)	8,9 – 2458,8	514 ± 526	427	38 (100)	13,4 – 427,2	101,9 ± 129,5	54	36 (100)
Fumonisinina B ₃ (FB ₃)	7,0 – 821,9	161 ± 152	140	38 (100)	4,5 – 141,7	36,8 ± 35,6	27	36 (100)
Fumonisinina total (FB ₁ +FB ₂)	35,3 - 4000	1271 ± 956	1373	34 (89,5)	57,7 – 1578,1	387,1 ± 42,5	244	36 (100)
	4001 – 8777,5	161 ± 152		4 (10,5)				
Fumonisin B ₁ hidrolisada (HBF ₁)	nd – 168,9	5053 ± 2541	8,5	4 (10,5)	nd	nd	nd	nd
Aflatoxinas								
Aflatoxina B ₁ (AFL B ₁)	nd – 2,31	0,52 ± 0,38	0,4	4 (10,5)	nd	nd	nd	nd
Aflatoxina G ₂ (AFL G ₂)	nd – 1,83	1,16 ± 1,01	nd	1 (2,6)	nd – 1,43	0,61 ± 0,28	0,5	5 (13,9)
Tricotecenos								
Desoxinivalenol (DON)	nd – 30,2	10,5 ± 3,3	nd	1 (2,6)	nd – 20,5	10,3 ± 1,75	nd	1 (2,8)
Nivalenol (NIV)	nd – 116,3	30,4 ± 16,8	25,5	4 (10,5)	nd – 67,43	31,7 ± 14,11	25,5	6 (16,7)
Zearalenona								
Zearalenone (ZON)	nd – 9,83	1,42 ± 2,68	9,8	9 (23,7)	nd – 6,49	0,95 ± 1,41	0,2	13 (36,1)
Hexadepsipeptídios								
Bovericina (BEA)	nd -157,8	22,3 ± 29,1	11,3	34 (89,5)	nd – 16,7	4,55 ± 3,52	3,6	33 (91,7)
Eniatina A (EA)	nd – 0,13	0,05 ± 0,01	nd	1 (2,6)	nd – 0,72	0,12, ± 0,14	nd	6 (16,7)
Eniatina A ₁ (EA ₁)	nd - 0,23	0,09 ± 0,04	0,8	6 (15,8)	nd	nd	0,1	nd
Eniatina B (EB)	nd – 4,95	0,62 ± 1,01	0,2	12 (31,6)	nd – 4,66	0,60 ± 1,15	0,2	8 (22,2)
Eniatina B ₁ (EB) ₁	nd – 1,25	0,22 ± 0,29	0,1	8 (21,1)	nd – 2,76	0,33 ± 0,61	0,1	7 (22,2)
Outras								
Agroclavina	nd – 7,24	1,16 ± 1,01	nd	1 (2,6)	nd	nd	nd	nd
Moniliformina (MON)	nd – 171,5	54,2 ± 34,1	41	6 (15,8)	nd – 119,4	42,7 ± 13,2	41	1 (2,8)

a) nd = não detectado. b) As médias foram computadas considerando que as amostras nd continham metade do LOD.

Os hexadepsipeptídios cíclicos, bovericina (BEA) e eniatinas, são metabólitos secundários de *Fusarium* que são frequentemente menos investigados através de métodos rotineiros. A bovericina é tóxica para várias culturas de células de vertebrados e invertebrados, induzindo apoptose, e é conhecida por ser uma molécula formadora de poros em membranas biológicas (LEMMENS-GRUBER *et al.*, 2000). Eniatinas são conhecidas por sua fitotoxicidade e atividade de antimicrobiana. Recentemente, BEA exibiu fitotoxicidade em protoplastos de tomate - conduzindo a morte de protoplastos e diminuindo o nível de ascorbato (CHEŁKOWSKI *et al.*, 2007). A Figura 23 apresenta o padrão de fragmentação espectral de algumas eniatinas encontradas.



Eniatina	R	R ₁	R ₂	A	B	C	D	E	M ⁺
B	iPr	CH ₃	CH ₃	86*	196*	296*	409	538	639
B ₁	sBu	CH ₃	CH ₃	100	210	310	423	552	653
B ₂	iPr	H	CH ₃	72	182	282	395	524	625
B ₃	iPr	H	H	72	182	282	395	510	-
B ₄	iBu	CH ₃	CH ₃	100	210	310	423	552	653

*presentes também nos espectros das eniatinas B₁, B₂, B₃ e B₄

Figura 23: Padrão de fragmentação espectral de massas para Eniatinas B, B₁, B₂, B₃ e B₄ (Visconti *et al.*, 1992).

Apesar da quantidade relativamente baixa de agroclavina (7,20 µg/kg) encontrada em uma amostra de milho, este é o primeiro relato no qual uma amostra de milho apresentou contaminação por este alcaloide de Ergot. A agroclavina modifica a memória espacial em ratos prejudicando a reprodução de reflexos de navegação condicionado no teste Morris de água. Este alcaloide modula a atividade de serotonina e sistemas noradrenérgicos do cérebro agindo como antagonista e agonista parcial de receptores de serotonina do tipo 2A (receptores 5-HT_{2A}) e como antagonista α₁-adrenoceptor (BOBKOVA *et al.*, 2002). A Figura 24 mostra o

cromatograma de íons totais no modo positivo da amostra contaminada por agroclavina, os sinais referentes às transições de quantificação (239,1→183,2) e de confirmação (239,1→208,2), assim como os respectivos íons. Além deste alcaloide de ergot, a amostra também apresentou contaminação por FB₁, FB₂, FB₃, KA, AFB₁ e BEA, corroborando para a importância da avaliação de uma análise multianálito. Infelizmente, há somente um número limitado de pesquisas relativas à análise de micotoxinas de *Fusarium* além de fumonisinas em misturas de ração para frangos, mas elas mostram claramente que este tipo de alimento deveria receber maior preocupação do ponto de vista micotoxicológico.

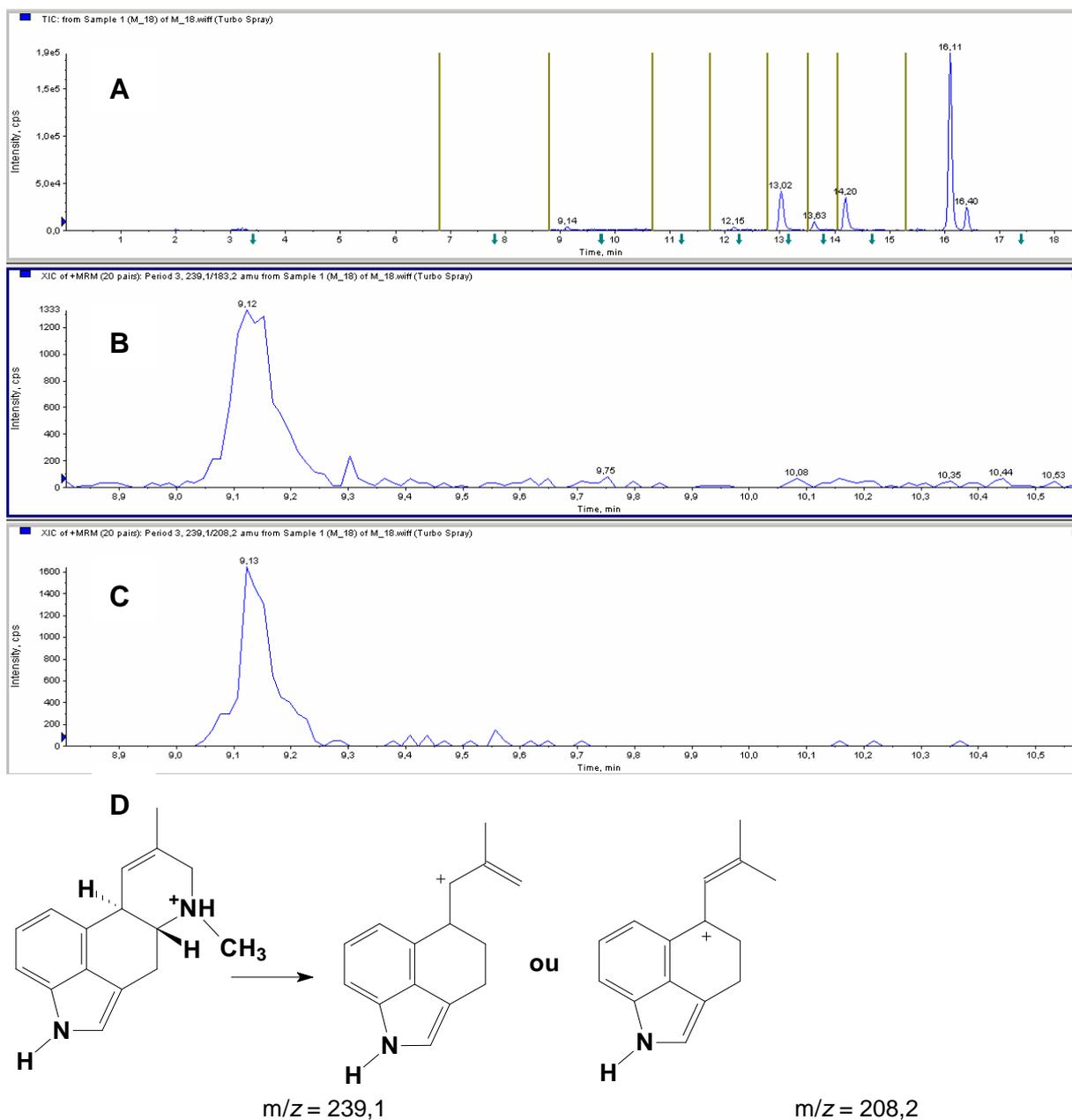


Figura 24: (A) Cromatograma de íons totais no modo positivo da amostra M 18 obtido por CLAE-EM/EM (ESI). (B) O sinal da agroclavina referente a transição de quantificação (239,1→183,2) e (C) de confirmação (239,1→208,2). (D) Esquema de fragmentação da agroclavina.

A Tabela 12 mostra a média dos níveis de micotoxinas encontrados nas amostras de milho coletadas durante o processamento do milho na fábrica de ração avícola e o número de amostras contaminadas. No total, foram analisadas nove amostras de cada etapa do processamento. Na análise de variância ANOVA dos resultados das micotoxinas que contaminavam 100% das amostras (FB1, FB2, FB3 e BEA) nenhuma diferença significativa a um nível de 95% de confiança foi observada entre as quatro etapas do processamento (Tabela 13). Apenas nas amostras de descarte foram detectados os níveis de contaminação mais elevados para todas as toxinas. A etapa de limpeza foi importante para remover e descartar o milho quebrado e danificado, onde foram encontrados os maiores níveis de contaminação. A contaminação com fumonisinas B₁, B₂ e B₃ ocorreu em 100% das amostras, com prevalência de FB₁ sendo distribuídos igualmente em todas as fases. Foram detectadas outras micotoxinas em baixos níveis como AFB₁, AFG₁, AFG₂, BEA, EA₁, EB e EB₁. O ácido cójico foi detectado em apenas uma amostra da etapa 3 (depois de secar e antes da 2ª limpeza) e em três amostras do produto de descarte em concentrações próximas do limite de detecção (LOD). Apesar de nenhum efeito adverso do ácido cójico (KA), o nível tolerável estabelecido em frangos foi de 146 mg/kg e o NOAEL (nenhum nível de efeito adverso observado) do ácido cójico para tumor de tireoide foi estabelecido em 15,5 mg/kg/dia em ratos e camundongos (BURDOCK *et al.*, 2001). TAKIZAWA *et al.* (2004) demonstraram fortes evidências para um comportamento promotor de tumor a uma concentração de 2% KA (20.000 mg/kg) na dieta de ratos. Nesta concentração o KA pode ser considerado como um agente hepatocarcinogênico fraco. As micotoxinas HFB₁, AFB₂ só foram encontradas em uma amostra, enquanto canoclavina em 3 das 9 amostras do produto para descarte e MON em 8 das 9 amostras do produto para descarte.

A Figura 25 mostra o cromatograma de íons totais no modo positivo de uma amostra contaminada por canoclavina, os sinais referentes às transições de quantificação (239,1→183,2) e de confirmação (239,1→208,2), assim como o esquema de fragmentação de um dos íons formados. Além deste alcaloide de ergot, a amostra também apresentou contaminação por FB₁, FB₂, FB₃, HFB₁, KA, AFB₁, ENB e BEA, corroborando para a importância da avaliação de uma análise multianálise.

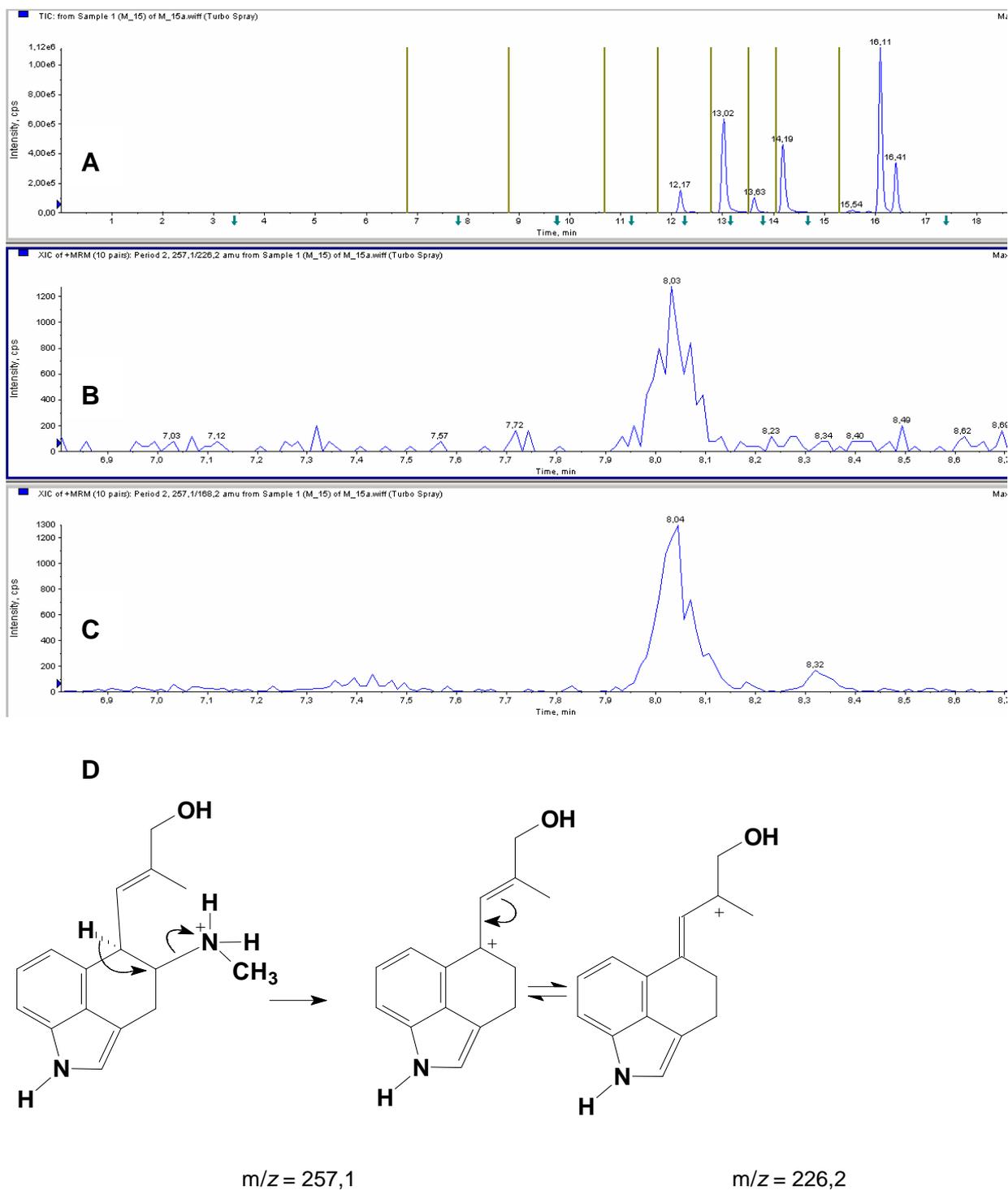


Figura 25: (A) Cromatograma de íons totais no modo positivo da amostra M 18 obtido por CLAE-EM/EM (ESI). (B) O sinal da agroclavina referente a transição de quantificação (239,1→183,2) e (C) de confirmação (239,1→208,2). (D) Esquema de fragmentação da agroclavina.

Tabela 12: Média da contaminação com micotoxinas encontradas em amostras de milho coletadas durante o processamento na fábrica de ração avícola.

Média das micotoxinas em amostras de milho ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^{a b}					
Toxina	Antes da 1 ^a limpeza e secagem	Depois da 1 ^a limpeza e antes da secagem	Depois da secagem e antes da 2 ^a limpeza	Depois da secagem e da 2 ^a limpeza	Descarte da primeira limpeza
Fumonisinias					
Fumonisina B ₁ (FB ₁)	1460 ^c	1520 ^c	1290 ^c	1440 ^c	18600 ^c
Fumonisina B ₂ (FB ₂)	620 ^c	620 ^c	550 ^c	590 ^c	7500 ^c
Fumonisina B ₃ (FB ₃)	220 ^c	210 ^c	200 ^c	210 ^c	2000 ^c
Fumonisina B ₁ hidrolisada (HFB ₁)	nd	nd	nd	nd	nd
Aflatoxinas					
Aflatoxina B ₁ (AFL B ₁)	0,80 (3/9)	0,90 (2/9)	nd	0,60 (3/9)	2,00 (4/9)
Aflatoxina B ₂ (AFL B ₂)	nd	nd	nd	nd	0,50 (2/9)
Aflatoxina G ₁ (AFL G ₁)	0,30 (1/9)	nd	nd	nd	0,30 (1/9)
Aflatoxina G ₂ (AFL G ₂)	nd	0,60 (1/9)	nd	nd	1,90 ^c
Hexadepsipeptídios					
Bovericina (BEA)	11,0 ^c	13,7 ^c	14,0 ^c	19,0 ^c	120 ^c
Eniatina A ₁ (EA ₁)	nd	0,10 (2/9)	0,10 (1/9)	nd	0,11 (2/9)
Eniatina B (EB)	0,22 (1/9)	0,71 (4/9)	0,54 (4/9)	0,42 (4/9)	0,74 (4/9)
Eniatina B ₁ (EB ₁)	0,12 (1/9)	0,29 (2/9)	0,24 (3/9)	0,12 (1/9)	0,31 (3/9)
Outras					
Ácido Cójico	nd	nd	97,0 (1/9)	nd	130,0 (3/9)
Canoclavina	nd	nd	nd	nd	1,40 (3/9)
Moniliformina (MON)	nd	nd	nd	nd	210,0 (8/9)

a) nd = não detectado; b) As médias foram computadas considerando que as amostras nd continham metade do LOD. O número de amostras contaminadas é dado entre parênteses. c) todas as amostras contaminadas do total de 9 analisadas.

Tabela 13: Resultado da análise da variância ANOVA das micotoxinas fumonisinias e bovericina nas quatro etapas do processamento do milho.

Micotoxina	F calculado	valor-P
FB1	1,313	0,287
FB2	0,491	0,691
FB3	1,021	0,396
BEA	1,100	0,363

$\alpha = 0,05$; F crítico = 2,901

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitiram concluir que:

Todas as amostras de milho e ração analisadas estavam contaminadas por fumonisinas, as médias da contaminação nas amostras de milho foram de $1156 \pm 1127 \mu\text{g/kg}$ para FB₁; $514 \pm 526 \mu\text{g/kg}$ para FB₂; $161 \pm 152 \mu\text{g/kg}$ para FB₃; enquanto nas amostras de ração foram mais baixas de $285,2 \pm 291,4 \mu\text{g/kg}$; $101,9 \pm 129,5 \mu\text{g/kg}$ e $36,8 \pm 35,6 \mu\text{g/kg}$ para FB₁, FB₂ e FB₃ respectivamente. Com relação à contaminação por HFB₁, 10,5% das amostras de milho apresentaram contaminação média de $5053 \pm 2541 \mu\text{g/kg}$, enquanto as amostras de ração não apresentaram contaminação. Algumas amostras excederam os níveis máximos estabelecidos pela CE. Isto leva a um aumento de risco à saúde do consumidor com relação à micotoxinas e enfatiza a urgência de estabelecer programas de monitoramento regular para micotoxinas em grãos em países em desenvolvimento. Os resultados indicam a necessidade urgente de um regulamento para fumonisinas no Brasil.

Com relação à contaminação por aflatoxinas e tricotecenos o percentual de contaminação foi baixo (2,5 a 10,5%) e as médias ficaram próximas ao LOD do método. Para ZON as médias foram de $1,42 \pm 2,68 \mu\text{g/kg}$ com 23,7% de amostras de milho contaminadas e $0,95 \pm 1,41 \mu\text{g/kg}$ de 36,1% das amostras de ração.

Este é o primeiro relato da contaminação por agroclavina, canoclavina, eniatina A, A1, B, bovericina e ácido cójico em amostras de milho e ração para frangos no Brasil. Embora o teor destas micotoxinas em milho tenha sido baixo, a maioria das amostras estava contaminada com mais de uma micotoxina analisada. Este estudo sugere que mais investigações são necessárias, pois esta pesquisa cobre somente dois anos, e a ocorrência pode mudar de ano a ano sugerindo que o monitoramento futuro de micotoxina no Brasil é justificado.

Não foi observada diferença significativa com relação à quantidade de micotoxinas entre as etapas de limpeza por peinação e de secagem no processamento do milho na fábrica de ração. Porém, como o produto de descarte da primeira limpeza apresentou maiores níveis de contaminação em todas as micotoxinas avaliadas, esta etapa mostrou-se importante no processamento.

Considerando o amplo espectro de micotoxinas avaliadas, de um modo geral a recuperação foi satisfatória para a maioria das micotoxinas, assim como o efeito da matriz não

foi relevante para a maioria delas. Portanto, o método de CLAE-EM/EM usado neste estudo constituiu uma alternativa para as técnicas convencionais de análise de micotoxinas. O uso de CLAE-EM/EM permitiu a detecção de um amplo espectro de micotoxinas, boa sensibilidade, rapidez e aplicabilidade em matrizes complexas como milho e ração a base de milho. Desta forma, poderá ser aplicado então como método rotineiro para tipos diferentes de alimentos como também teste de produção de alimentos desde que a recuperação e o efeito matriz sejam avaliados e o método validado para cada matriz.

Das 101 micotoxinas analisadas foram detectadas e quantificadas nas amostras 20 micotoxinas: FB₁, FB₂, FB₃, HFB₁, AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, DON, NIV, ZON, BEA, EA, EA₁, EB, EB₁, MON, KA, agroclanina e canoclavina. A coocorrência de micotoxinas em muitas amostras mostra a importância do desenvolvimento de um método cujo espectro de micotoxinas seja o mais amplo possível, pois, tanto um fungo pode produzir mais de uma micotoxina quanto a amostra pode estar contaminada por mais de um fungo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABI Expert Training Center, BIOSYSTEMS., Applied (Org.). Espectrometria de Massas e suas Aplicações. **ABI Expert Training Center** São Paulo: 2005.

ASAO, T.; BUCHI, G; ABDEL-KADER, M. M.; CHANG, S. B.; WICK, E. L.; WOGAN, G. N. , **Journal American Chemical Society**, v. 85, p. 1706- 1707, 1963.

BAGGIO, Érica Cristina Ramírez. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos: Determinação de aflatoxina M₁ em leite pasteurizado pelos métodos de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade. Curitiba, 2006. 95 f.

BECKER, M.; DEGELMAN, P.; HERDERICH, M.; SCHREIER, P.; HUMPF, H. Column liquid chromatography–electrospray ionisation–tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin. **Journal of Chromatography A**, v. 818, n. 2, p. 260-264, 1998.

BENNETT, G. A.; NELSEN, T. C.; MILLER, B. M. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of zearalenone in corn, wheat, and pig feed: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 6, p. 1500-9, 1994.

BETINA, V. - Chromatography of Mycotoxins - techniques and applications, **Elsevier, Amsterdam**, 440p, 1993.

BEZUIDENHOUT, S.C., GELDERBLOM, W.C.A., GORST-ALLMAN, C.P. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of Chemical Soc Chemical Communications**, v.11, p.743-745, 1988.

BIEHL, M. L. e BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987

BISELLI, S. e HUMMERTT, C., Development of a multicomponent method for *Fusarium* toxins using LC-MS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 8, p. 752-760, 2005.

BISELLI, S.; HARTIG, L.; WEGENER, H.; HUMMERT, C. Analysis of *Fusarium* toxins using LC-MS/MS. **Spectroscopy**, v. 20, p. 20-28, 2005.

BISELLI, S.; HARTIG, L.; WEGNER, H.; HUMMERT, C. Development of a multiresidue method for analyses of major type B trichotecenes. **LC-GC Europe**, v. 17, p. 25-35, 2004.

- BITTENCOURT, A. B. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; CORREA, B., Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in Sao Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 16(2), p. 117-120, 2005.
- BOBKOVA, N. V.; UTESHEV, V. K.; MEDVINSKAYA, N. I.; NESTEROVA, I. V. e ARINBASAROV, M. U., , Mechanisms of Amnestic Effect of Ergot Alkaloid Agroclavin, **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 133 (4), p. 366-368, 2002.
- BRASIL, 1988. Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88 - publicada no **Diário Oficial da União** de 09 de novembro de 1988 - Seção I, página 21.968.
- BRASIL, 1996. Ministério da Agricultura Portaria MAARA nº 183 de 21 de março de 1996, publicada no **Diário Oficial da União** de 25 de março de 1996, Seção I, página 4929.
- BRASIL, 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº. 274, de 15 de outubro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial da União**, 16/10/2002.
- BURDOCK, G. A.; SONI, M. G.; CARABIN, I. G. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33(1), p. 80-101, 2001.
- BURFENING, P.J. Ergotism. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 163(11), p.1288-1290, 1973.
- CALDAS, E. D.; JONES, A. D.; WINTER, C. K.; WARD, B.; GILCHRIST, D. G. Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Sphinganine Analog Mycotoxins. **Analytical Chemistry**, v. 67(1), p. 196-207, 1995.
- CALDAS, E.D.; SILVA, A.C.S. Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 7974–7980, 2007.
- CALDAS, E. D.; SILVA, S. C. e OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista e Saúde Pública**, v. 36(3), p. 319-23, 2002.
- CAST. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. **Council for Agricultural Science and Technology**. Ames, Iowa, USA, p.199, 2003 (Task Force Report, n 130).
- CHAMBERS, ERIN; WAGROWSKI-DIEHL, DIANE M.; LU, ZILING; MAZZEO, JEFFREY R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in

LC/MS/MS analyses. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 852, p. 22-34, 2007.

CHELKOWSKI, J.; RITIENI, A.; WISNIEWSKA, H.; MULE, G. e LOGRIECO, A. Occurrence of Toxic Hexadepsipeptides in Preharvest Maize Ear Rot Infected by *Fusarium poae* in Poland. **Journal of Phytopathology**, v.155, p. 8-12, 2007.

COMISSÃO REGULADORA N° 1881/2006 de 19 de dezembro de 2006. fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. **Jornal Oficial da Comunidade Europeia L364**: 5-24, 2006.

DILKIN, P.; MALLMANN, C.A.; ALMEIDA, C.A.A.; STEFANON, E.B.; FONTANA, F.Z.; MILBRADT, E.L. Production of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* according to temperature, moisture and growth period. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 111-118, 2002.

DIONELLO, R.G.; RADIINZ, L.L.; ELIAS, M.C.; MEIRELLES, M.C.A. Método de secagem e sistema de armazenamento na ocorrência de micotoxinas em milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 25, p. 09-15, 2000.

DOERGE, D. R.; HOWARD, P. C; BAJIC, S; PREECE, S, GAMES, D. E. Determination of fumonisins using on-line liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 8(8): p. 603-606, 1994.

EGMONG, H.P.V. Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference materials. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 3, p. 321-330, 1995.

EU Commission Decision 2002/657/EC: Commission decision laying down analytical methods to be used for certain substances and residues thereof in animals and animal products according to Council Directive 96/23/EC. Final draft version approved.

EU Commission Decision 2002/67/EC implementing Council Directive 96/23/EC considering the performance of analytical methods and the interpretation of results, Brussels, 2002.

FIGUEIRA, E. L. Z.; COELHO, A. R.; ONO, E. Y. S.; HIROOKA, E. Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. Semina: **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 24, n. 2, p. 359-378, 2003.

FRISVAD J. C. , THRANE U. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-

VIS spectra (diode array detection). **Journal of chromatography** , v. 404, n .1, p. 195-214, 1987.

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

GELDERBLUM, W.C.A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F.O. Fumonisin: novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Appl Environmental Microbiology**, v. 54, p.1806-1811, 1988.

HARTL, M.; HUMPF, H. -U. Simultaneous determination of fumonisin B₁ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn products by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 5078-5083, 1999.

HIROOKA, E.Y., SHIBATA, M.M., VIOTTI, N.M.A., et al. Fumonisin: importância da nova micotoxina de *Fusarium moniliforme* em intoxicações animais no Norte do Paraná. **Revista de Microbiologia**, v. 22, p. 312, 1991

HIROOKA, E.Y., YAMAGUCHI, M.M., AOYAMA, S., SUGIURA, Y. e UENO, Y. The natural occurrence of fumonisin in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, v.13, p.173-183, 1996.

HOWARD, P. C.; CHURCHWELL, M. I.; COUCH, L. H.; MARQUES, M. M.; DOERGE, D. R.. Formation of N-(Carboxymethyl) fumonisin B₁, Following the Reaction of Fumonisin B₁ with Reducing Sugars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3546-3557, 1998.

HUMPF, H.U e VOSS, K.A. Review effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins, **Molecular Nutrition & Food Research**. V. 48, n. 4, p. 255-69, 2004.

HUSSEIN, H S. e BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101–134, 2001.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some natural occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic aromatic Amines and Mycotoxins, International Agency for Research on Cancer, Lyon, vol. 56, p.489, 1993.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER). Monograph on the Evaluations of Carcinogenics Risks to Human. Lyon, v. 82, n. 171, 2002.

IBGE, 2008a tabelas disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/indicadoresagro_19962003/tab6s.pdf Acessado em 17/04/2008.

IBGE, 2008b disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?id_noticia=417 Acessado em 17/04/2008

ILHA, M. R. S.; RIET-CORREA, F. e BARROS, C. S. L. Síndrome distérmica (hipertermia) em bovinos associada à intoxicação por *Claviceps purpúrea*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 81-86, 2001

JESTOI, M.; AURASAARI, S.; ROKKA, M.; RIZZO, A.; PELTONEN, K. Determination of *Fusarium* mycotoxins beauvericin and enniatins (A, A1, B, B1) in eggs of laying hens using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), **Journal Liquid Chromatography and Related Technology**, v. 28, p. 369, 2005.

JODLBAUER, J.; ZÖLLNER, P.; LINDNER, W. Determination of zearanol, taleranol, zearalenone, α - and β -zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 51, n. 11-12, p. 681-687, 2000.

JOOS, P. E.; VAN RYCKEGHEM, M. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry of Some Anabolic Steroids. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 20, p. 4701-4710, 1999.

JOSEPHS, J. L. Detection and Characterization of Fumonisin Mycotoxins by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Using Ion Trap and Triple Quadrupole Mass Spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 10, n. 11, p. 1333-1344, 1996.

JOSEPHS, R.; SCHUHMACHER, R.; KRŠKA, R. International interlaboratory study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol in agricultural commodities. **Food Additives and Contaminants**, v.18, n.5, p. 417-430, 2001.

JÚNIOR, M.M.; SOARES, L.M.V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLETTO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenona in brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 1001-1007, 2001.

KLEINOVA, M.; ZÖLLNER, P.; KAHLBACHER, H.; HOCHSTEINER, W.; LINDNER, W. Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter zeranol in urine, liver, and muscle of heifers. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4769-4776, 2002.

KROGH, R. Tese de Doutorado. Faculdade de Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Identificação Química e Estudos Farmacológicos dos Constituintes da Espécie *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae). Estudos em Química Medicinal de Análogos do Ácido Gálico., Santa Catarina, 2001.

KROGH, P.; ELLING, F.; FRIIS, C.H.R.; HALD, B.; LARSEN, A.E.; LILLHOJ, E.B.; MADSEN, A.; MORTENSEN, H.P.; RASMUSSEN, F.; RAVNSKOV, U. Porcine nephropathy induced by long-term ingestion of ochratoxin A. **Veterinary Pathology, Lawrence**, v.16, p.446-475, 1979.

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

KRSKA, R.; JOSEPHS, R. State-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 369, p. 469-476, 2001b.

KRSKA, R.; SCHUHMACHER, M.; GRASSERBAUER, P.M.; SCOTT, Determination of the Fusarium at µg/kg levels in corn by high performance liquid chromatography with diode array detection. **Journal Chromatography A**, v. 746, n. 2, p. 233-238, 1996.

KRSKA, R.; WELZIG, E.; BERTHILLER, F.; MOLINELLI, A.; MIZAIKOFF, B. Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance, **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p.345-353, 2005.

LACEY J. Natural occurrence of mycotoxins in growing and conserved forage crops. **Mycotoxins and Animal Foods.**, p.363-397. In: Smith J.E. & Henderson R.S. (ed.) CRC, Boca Raton. 1991.

LANGSETH, W. e 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.

LAU BPY, SCOTT PM, LEWIS DA e KANHERE SR. Quantitative determination of ochratoxin A by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35: p. 23-32 , 2000.

LAWLEY, Richard (2008) Leatherhead Food International, Randalls Road, Leatherhead, Surrey KT22 7RY, England. Zearalenona. Disponível em <http://www.micotoxinas.com.br/zearafacts.htm>. Acesso em 23/09/2008.

LAWLEY, Richard (2008) Leatherhead Food International, Randalls Road, Leatherhead, Surrey KT22 7RY, England. Moniliformin. Disponível em <http://www.micotoxinas.com.br/monilifacts.htm>. Acesso em 23/09/2008.

Leatherhead Food Research Association, Randalls Road, Leatherhead, Surrey KT22 7RY, England. OCHRATOXIN A. Disponível em <http://www.micotoxinas.com.br/ocrafacts.htm> Acesso em 23/09/2008.

Leatherhead Food Research Association, Randalls Road, Leatherhead, Surrey KT22 7RY, England. CITRININ A. Disponível em <http://www.micotoxinas.com.br/citrininfacts.htm> Acesso em 23/09/2008.

Leatherhead Food Research Association, Randalls Road, Leatherhead, Surrey KT22 7RY, England. PATULIN. Disponível em <http://www.micotoxinas.com.br/patufacts.htm> Acesso em 23/09/2008.

LEHNER, A. F.; CRAIG, M.; FANNIN, BUSH N.; L. e TOBIN T. Electrospray^[+] tandem quadrupole mass spectrometry in the elucidation of ergot alkaloids chromatographed by HPLC: screening of grass or forage samples for novel toxic compounds. **Journal of Mass Spectrometry**; 40: 1484–1502, 2005.

LEONI, L.A.B. e SOARES, L.M.V. Survey of moniliformin in corn cultivated in the state of São Paulo and in corn products commercialized in the city of Campinas, SP. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n.1, p. 13-15, 2003.

LEMMENS-GRUBER, R., RACHOY, B., STEININGER, E., KOURI, K., SALEH, P., KRŠKA, R., JOSEPHS, R., LEMMENS, M. The effect of the Fusarium metabolite beauvericin on electromechanical and physiological properties in isolated smooth and heart muscle preparations of guinea pigs. **Mycopathologia**, v. 149, p. 5–12, 2000.

- LINDENMEIER, M.; SCHIEBERLE, P.; RYCHILIK, M. Quantification of ochratoxin A in foods by a stable isotope dilution assay using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, n. 2, p. 57-66, 2004.
- LINO, C. M.; SILVA, L. J. G. E PENA, A. S. METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DAS FUMONISINAS EM MILHO E ALIMENTOS À BASE DE MILHO. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 293-299, 2006.
- MAYORGA, R. D.; TABOSA, F. J. e MAYORGA, R. O. Estrutura do mercado brasileiro da carne de frango. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/6/310.pdf> acessado em setembro 2008.
- MALLMANN, C. A. ; WENTZ, I. ; SANTURIO, J.M. Zearalenona: aspectos clínicos toxicológicos. **A Hora Veterinária**, v. 8, p. 45-48, 1989.
- MALLMANN, C., SANTURIO, J.M., DILKIN, P., et al. Incidência de fumonisina B1 em milho e rações no Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 7, 1997, Maracay, Venezuela. Anais... Maracay : **Sociedad Latinoamericana de Micotoxicologia**, 1997. p.73.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R. A.. Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 1, p. 61-99, 2007.
- MARASAS, W.F.O., KELLERMAN, T.S., GELDERBLUM, W.C.A., et al. Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, p.197-203, 1988.
- MEDINA, M. B. E SCHWARTZ, D. P. A multi-residue TLC screening procedure for anabolic estrogens and detection of estradiol, DES or zeranol in chicken muscle tissue extracts. **Food Additives & Contaminants**, v.4, n.4, p. 415-27, 1987.
- MEIRELLES, M.C.A., CORRÊA, B., FISCHMAN, O. Leucoencefalomalacia (LEME) no Brasil I- Aspectos epizootiológicos e micotoxicológicos dos surtos ocorridos nos anos de 1988 a 1990. **Revista de Microbiologia**, v.22, p. 316, 1991.
- MERRILL, A.H., VAN ECHTEN, G., WANG, E. Fumonisin B₁ inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neuron in situ. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.2299-2306, 1993.

MILANEZ, T. V. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Tricotecenos em milho: otimização e avaliação de método analítico utilizando cromatografia a gás associada à espectrometria de massas e levantamento da incidência em milho e em produtos de milho no estado de São Paulo, 2003.

MILANEZ, T. V.; VALENTE-SOARES, L. M.; BAPTISTA, G. G. Occurrence of trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products. **Food Control**, v. 17, p. 293-298, 2006.

NOTA TÉCNICA, 2408 Surto de Beri-Beri em municípios do Maranhão. MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_beriberi2408.pdf acessado em 2008.

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

OPAS. Micotoxinas. Criterios de Salud Ambiental, 11. Whashington, 1983, p. 131.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Jecfa), 56th meeting, Geneva, 6-15 February 2001, 21

ORSI, R.B., CORRÊA, B., POZZI, C.R., et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v.36, p. 75-87, 2000.

PÁDUA, I. P. M.; SILVEIRA I. A.; MARTINS, C. E. C. B. Aflatoxinas e risco de contaminação do leite humano. **Pro Homine**, v. 1, n. 1, 2002.

PAPP, E; H-OTTA, K; ZÁRAY, G; MINCSOVICS, E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins **Microchemical Journal**, v. 73, p. 39-46, 2002.

PATERSON, J.; FORCHERIO, C.; LARSON, B.; SAMFORD, M. e KERLEY, M. The effects of fescue toxicosis on beef cattle productivity. **Journal of Animal Science.**, v. 73, n. 3, p. 889-898, 1995.

PINAZZA, L. A. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA Secretaria de Política Agrícola – SPA. Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura – IICA. SÉRIE AGRONEGÓCIOS. **Cadeia Produtiva do Milho**. v. 1, 2007.

POZZI, C. R.; CORREA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CHACON-RECHE, N. O.; MEIRELLES, M. C. A. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Additives and Contaminants.**, v. 12, p. 313-319, 1995.

POZZI, C.R.; ARCARO, J.R.P.; JÚNIOR, A.I.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.

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

PRADO, G.; VIEIRA, M.B.C.M.; SANTOS, J.P.; OLIVEIRA, M.S. Ocorrência de micotoxinas em milho pós-colheita e armazenado no Estado de Minas Gerais, Safra 1991. **Higiene Alimentar**, v. 9, n. 35, p. 24-27, 1995.

RAZZAZI-FAZELI, E.; RABUS, B.; CECON, B.; BOHM, J.; Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 968, p. 129, 2002.

RAZZAZI-FAZELI, E.; BOHM, J.; JARUKAMJORN, K.; ZENTEK, J. Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography -mass spectrometry. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 796(1), p. 21-33, 2003.

REGULAMENTO (CE) N.º 401/2006 DA COMISSÃO de 23 de Fevereiro de 2006. Que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:PT:PDF>. Acessado em 20 Janeiro de 2009.

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

ROYER, D.; HUMPF, H. -U.; GUY, P. A. Quantitative analysis of Fusarium mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric

pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants**, v. 21, n. 7, p. 678-692, 2004.

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

SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais, Parte 1. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 46, n. ½, p. 65-71, 1986

SALAY, E. e MERCADANTE, A. Z., 2002. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control** 13: 87-92.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Micotoxinas do *Fusarium* spp. na avicultura Comercial – Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**, v.31, n.1, p.185-190, 2000.

SANTOS, E. A.; VARGAS, E. A. Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 5, p. 447-458, 2002.

SCHNEWEIS, I.; MEYER, K.; ENGELHARDT, G.; BAUERO, J. Occurrence of zearalenone-4-D-glucopyranoside in wheat. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1736-1738, 2002.

SCOTT, P.M. Fumonisin. **International Journal of Microbiology**, v.18, p.257-270. 1993.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**, 1. ed. Florianópolis: Insular, 1998.

SEWRAM, V.; MSHICILELI, N.; SHEPHARD, G. S.; VISMER, H. F.; RHEEDER, J. P.; LEE, Y. W.; LESLIE, J. F.; MARASAS, W. F. O. Production of Fumonisin B and C Analogues by Several *Fusarium* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4861-4866, 2005

SHEPHARD, G. S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 31-39, 1998.

SILVA C. M, VARGAS E A. A survey of zearalenone in corn using Romer Mycosep TM 224 column and high performance liquid chromatography. **Food Additives and Contaminants, Brasil**, v. 18, n. 1, p. 39-45, 2001.

SILVA, L.J.G.; LINO, C.M.; PENA, A, MOLTO, J.C. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in Portuguese maize and maize-based foods intended for human consumption. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 4, p. 381-390, 2007.

SOGSERMSAKUL e RAZZAZI-FAZELI. A review of recent trends in application of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. **Journal of Liquid chromatography & Related Technologies**, v.31, p. 1641-1686, 2008.

SOLOVEY, M.M.; SOMOZA, C.; CANO, G.; PACIN, A. e RESINIK, S. Survey of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, n. 8, p. 325-329, 1999.

SONGSERMSAKUL, G.; SONTAG, M.; CICHNA-MARKL, J.; ZENTEK, E.; RAZZAZI-FAZELI, Analytical technologies in the biomedical and life sciences **Journal of Chromatography B** (2006).

SORENSEN, L. K.; ELBAEK, T. H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 820, n. 2, p. 183-196, 2005.

SORIANO, J.M. e DRAGACCI, S. Review: Occurrence of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37, p. 985-1000, 2004.

STOLOFF, L. A multi mycotoxin detection method for aflatoxins **Carcinogenicity of aflatoxins. Science**, v. 237, p. 1283-4, 1987.

SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRASKA, R.; SCHUHMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 18, p. 2649-2659, 2006.

SULYOK, M.; KRASKA, R. e SCHUHMACHER, R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1505-1523, 2007a.

SULYOK, M.; KRASKA, R.; SCHUHMACHER, R. Application of a liquid chromatography – tandem mass spectrometric multi mycotoxin method to different raw cereals and evaluation of matrix effects. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, p. 1184-1195, 2007b.

- SWEENEY, M. J. e DOBSON, A. D. W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **Microbiology Letters**, n. 175, p. 149-163, 1999.
- SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; STOCKENSTROM, S. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 2014-18, 1991.
- SYDENHAM, E.W., GELDERBLOM, W.C.A., THIEL, P.G., et al. Evidence for the natural occurrence of Fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.285-290, 1990.
- TAKINO, M; TANAKA, T; YAMAGUSCHI, K; NAKAHARA, T. Atmospheric pressure photo-ionization liquid chromatography/mass spectrometric determination of aflatoxins in food. **Food Additives and Contaminants**, v.21, n. 1, p. 76-84, 2004.
- TAKIZAWA, T.; IMAI, T.; ONOSE, J.; UEDA, M.; TAMURA, T.; MITSUMORI, K.; IZUMI, K. E HIROSE, M., Enhancement of Hepatocarcinogenesis by Kojic Acid in Rat Two-Stage Models after Initiation with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine or N-diethylnitrosamine. **Toxicological Sciences**, v.81, p. 43-49, 2004.
- THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., SYDENHAM, E.W., et al. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn human and animal health. **Mycopathology**, v.117, p.3-9, 1992.
- UHLIG, S.; JESTOI, M.; KNUTSEN, A. K.; HEIER, B. T. Multiple regression analysis as a tool for the identification of relations between semi-quantitative LC-MS data and cytotoxicity of extracts of the fungus *Fusarium avenaceum* (syn. *F.arthrosporioides*) **Toxicon**, v. 48, p. 567-579, 2006.
- UHLIG, L. e IVANOVA, Determination of beauvericin and four other enniatins in grain by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1050, p. 173, 2004.
- VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 75-92, 1998.
- VAN BENNEKOM, E.O., BROUWER, L.; LAURANT, E.H.M.; HOOIJERINK, H.; NIELEN, M.W.F. Confirmatory analysis method for zearanol, its metabolites and related mycotoxins in urine by liquid chromatography-negative ion electrospray tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 473, p. 151-160, 2002.

VARGAS, E.A.; PREIS, R.A.; CASTRO, L.; SILVA, C.M.G. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenona and fumonisin B1 in brazilian corn. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 11, p. 981-986, 2001.

VELAZQUEZ C; LLOVERA M; PLANA J; CANELA R. Effect of solvents on the fumonisins analysis by high-performance liquid chromatography with AccQ-Fluor as the derivatizing reagent.. **Journal of chromatography. A**, v. 870(1-2), p. 469-72, 2000.

VENTURA M, GUILLEN D, ANAYA L, BROTO-PUIG F, LLIBERIA JL, AGUT M, COMELLAS L. Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A in beer. **Rapid Commun Mass Spectrom** v. 20, p. 3199–3204, 2006.

VENTURA, M.; VALLEJOS, C.; ANAYA, I. A.; MONTSERRAT, F. B. -P.; COMELLAS L. Analysis of ochratoxin A in coffee by solid-phase cleanup and narrow-bore liquid chromatography-fluorescence detector-mass spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 26, p. 7564-7567, 2003.

VISCONTI, A.; BLAIS, L. A.; APSIMON, J. W.; GREENHALGH, R. E MILLER, J. D. Production of enniatins by *Fusarium a cuminatum* and *Fusarium compactum* in liquid culture: isolation and characterization of three new enniatins, B2, B3, and B. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1076-1002, 1992.

VISCONTI, A.; PASCALE, M. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p.133-140,1998.

WANG, E., NORRED, W.P., BACON, C.W., et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 1486-1490, 1991.

WOGAN, G.N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Progress in Clinical & Biological Research**.,v. 374,p. 123-37, 1992.

YAMAGUCHI, M.M., HIROOKA, E.Y., SHIBATA, T.M.M., Fumonisin em milho no Estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS 7, São Paulo, 1992. **Anais. São Paulo : Instituto Adolfo Lutz**, p. 27, 1992.

ZEPNIK H., VOLKEL, W. e DEKANT, W. Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F344 rats after oral administration. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 192, p. 6, 2003.

ZÖLLNER, P.; JODLBAUER, J.; KLEINOVA, M.; KAHLBACHER, H.; KUHN, T.; HOCHSTEINER, W.; LINDNER, W. Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2494-2501, 2002.

ZÖLLNER, P.; JODLBAUER, J.; LINDNER, W. Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP-18 columns or immunoaffinity columns. **Journal of Chromatography A**, v. 858, n. 2, p. 167-174, 1999.

ZÖLLNER, P.; LEITNER, A.; LUBDA, D.; CABRERA, K.; LINDNER, W. Application of a chromolith speedROD RP-18e HPLC column: Determination of ochratoxin A in different wines by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 52, n. 11-12, p. 818-820, 2000b.

ZÖLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxins analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmosphere pressure ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 123-169, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)