

Avaliação intralaboratorial e otimização de método para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia a gás-espectrometria de massas

Intralaboratorial evaluation and optimization of a method for determination of trichothecenes in corn by gas chromatography-mass spectrometry

RIALA6/969

Thaís Valéria MILANEZ^{1*}, Lúcia M. VALENTE SOARES, Gisleine Gomes BAPTISTA¹

* Endereço para correspondência: ¹Seção de Química Biológica, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo, SP

² Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, Campinas/SP
Recebido: 31/10/2003 – Aceito para publicação: 12/02/2004

RESUMO

Tricotecenos são micotoxinas produzidas por diferentes espécies de *Fusarium*. Estas micotoxinas formam um grupo de cerca de mais de cem compostos caracterizados pela presença em suas estruturas do mesmo sistema de anéis tetracíclicos cirpenol. Alguns deles são contaminantes naturais em trigo e milho, como o desoxinivalenol (DON), o nivalenol (NIV), a toxina T-2 (T2), o diacetoxiscirpenol (DAS) e a toxina HT-2 (HT2). No presente trabalho foram avaliados e otimizados sistemas de limpeza, extração e derivação para determinação simultânea de DON, NIV, DAS, HT2 e T2 em amostras de milho e seus produtos por cromatografia a gás associada à espectrometria de massas (CG/EM). A extração com acetoneitrila:água (84:16) seguida de limpeza com coluna MycoSep 227 apresentou os melhores resultados para as cinco toxinas estudadas. A derivação com anidrido trifluoroacético / bicarbonato de sódio mostrou-se melhor tanto para a detecção como para quantificação dos tricotecenos estudados por CG/EM. As recuperações obtidas variaram de 83,3 a 113,3% para DON, 84,6 a 114,5% para NIV, 52,1 a 122,7% para DAS, 71,1 a 95,9% para T2 e de 81,8 a 155,4% para HT2. Os limites de detecção variaram de 20 a 50 ng/g para DON, de 10 a 40 ng/g para NIV, de 30 a 120 ng/g para DAS, de 20 a 100 ng/g para T2 e de 20 a 50 ng/g para HT2. A repetitividade do método mostrou desvios padrão relativos variando de 4,5 a 18,1 para DON, 2,9 a 15,4 para NIV, 3,4 a 48,1 para DAS, 3,1 a 14,4 para HT2 e de 6,4 a 47,3 para T2.

Palavras-Chave. tricotecenos, micotoxinas, milho, cromatografia a gás, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Trichothecenes are the mycotoxins produced by different *Fusarium* species. Some of them, such as deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxins T-2 (T2) and HT-2 (HT2), are natural contaminants of wheat and corn. Extraction, clean-up and derivatization steps were evaluated and optimized for simultaneous determination of DON, NIV, DAS, HT2 and T2 in corn and corn products samples by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Extraction with acetonitrile : water (84:16) followed by clean-up through MycoSep 227 column presented the best results for the five toxins analysed. Trifluoroacetic anhydride / sodium bicarbonate derivatization showed better detection and quantification for the trichothecenes studied by GC/MS. The recoveries ranged from 83.3 to 113.3% for DON, 84.6 to 114.5% for NIV, 52.1 to 122.7% for DAS, 71.1 to 95.9% for T2 and from 81.8 to 155.4% for HT2. The detection limits ranged from 20 to 50 ng/g for DON, from 10 to 40 ng/g for NIV, from 30 to 120 ng/g for DAS, from 20 to 100 ng/g for T2 and from 20 to 50 ng/g for HT2. The repeatability of the method had relative standard deviations ranging from 4.5 to 18.1 for DON, 2.5 to 15.4 for NIV, 3.4 to 48.1 for DAS, 3.1 to 14.4 for HT2 and from 6.4 to 47.3 for T2.

Key Words. mycotoxins, trichothecenes, corn, gas chromatography, mass spectrometry.

INTRODUÇÃO

Tricotecenos são micotoxinas de ampla ocorrência em cereais. Isolados e caracterizados como contaminantes naturais em trigo e milho estão o desoxinivalenol (DON), o nivalenol (NIV), o diacetoxiscirpenol (DAS) e as toxinas T-2 (T2) e HT-2 (HT2). Todos produzidos exclusivamente por espécies de *Fusarium*²⁷. Dentre todos, o DON é o de maior ocorrência em alimentos e rações animais e também o menos tóxico²⁴. Os tricotecenos apresentam efeitos tóxicos tais como vômito, angina necrótica, diarreia, anorexia^{22,28}. Ainda, a presença de toxina T2 em grãos está relacionada à doença humana chamada Aleucia Tóxica Alimentar (ATA)³¹.

O milho é um dos substratos mais susceptíveis a este tipo de contaminação, porém os dados são ainda escassos sobre a ocorrência de tricotecenos em milho brasileiro.

A detecção e a determinação destas micotoxinas deve ser realizada por métodos sensíveis e específicos, pois além de ocorrerem em níveis de ng/g (ppb), constituem também um grupo de estruturas muito semelhantes exigindo métodos que além de as separar, também confirme suas identidades. Inicialmente foi utilizada a cromatografia em camada delgada auxiliada por agentes reveladores⁹. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem sendo usada para tricotecenos do grupo B, os quais apresentam uma pequena absorção no ultravioleta. Já para tricotecenos do grupo A, técnicas de derivação tem sido empregadas para determiná-los por CLAE¹⁵, bem como por cromatografia a gás (CG). Atualmente CG é das técnicas a mais utilizadas principalmente acoplada à espectrometria de massas (EM). ACG, devido à sua capacidade superior de resolução, permite a separação e a determinação simultânea dos tricotecenos dos grupos A e B. Entretanto esta técnica requer, em geral, etapas de limpeza mais trabalhosas, envolvendo freqüentemente partição em conjunto com colunas de extração em fase sólida.

Os sistemas de extração de tricotecenos utilizam misturas de solventes polares, como acetonitrila e metanol, misturados com água. No processo de clarificação, um dos precipitantes mais utilizados é o sulfato de amônio e se a amostra for gordurosa faz-se uma etapa extra de desengorduramento seja com hexano ou isotano por exemplo. Para limpeza são muito utilizadas colunas de extração em fase sólida e os adsorventes utilizados são os mais variados, como carvão ativo, Celite, alumina e Florisil^{3,8,17}.

O processo de derivação se faz necessário quando se utiliza a CG, pois reduz a polaridade de grupamentos livres, aumenta a volatilidade, introduz grupos que tornam o composto adequado para o sistema de detecção e, além de tudo, possibilita a separação de substâncias muito semelhantes entre si no seu estado natural. Para os tricotecenos as derivações mais usuais são a siliilação, a fluoroacetilação e a fluoroalquilação^{2,5,7}.

Neste trabalho foram avaliados e otimizados sistemas de extração, limpeza e derivação para determinação simultânea de DON, NIV, DAS, HT2 e T2 utilizando cromatografia a gás associada à espectrometria de massas. A metodologia otimizada

foi avaliada intralaboratorialmente através da verificação da recuperação, repetitividade e limite de detecção para os tricotecenos estudados em milho e produtos de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Amostras de milho e produtos de milho, entre eles farinha de milho, canjica, fubá, sêmola, quirera, milho verde em lata e flocos de milho, provenientes do estado de São Paulo, foram moídas até 16 mesh, embaladas em sacos plásticos duplos e armazenadas em congelador a -18°C até o momento da análise.

Padrões

Foram preparadas soluções estoque ao redor de 100µg/ml de desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) (SIGMA) em acetonitrila, e de diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas T-2 (T2) e HT-2 (HT2) (SIGMA) em metanol, e soluções de trabalho em cerca de 10 µg/mL, todas acondicionadas em frascos bem fechados, protegidos da luz e armazenados a -18°C.

Padrões internos

Soluções de alfa-cloralose 80 µg/mL (SIGMA) em metanol e de éster metílico do ácido araquídico (Poly Science) 100 µg/mL em hexano, foram preparadas e acondicionadas em frasco âmbar a -18°C.

Solventes e Reagentes

Trimetilclorosilano, n-trimetilsilimidazol, anidrido trifluoroacético, 4-dimetil aminopiridina, imidazol (SIGMA) e anidrido pentafluoropropiônico (Pierce). Colunas de extração em fase sólida MycoSep 225 e 227 (Romer Labs).

Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas

Equipamento modelo GCQ (Finnigan MAT) com *ion trap* operando com impacto de elétrons (70 eV). Processador de dados Xcalibur 1.1. Coluna capilar Rtx-5MS (5% difenil-95% dimetil polisiloxano) com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (Restek). Temperatura do injetor: 260°C. Programação do forno: 80°C/0,20 min, 22°C/min, 205°C/0,25min, 2°C/min até 270°C, fluxo constante, velocidade 40,0 cm/s.

Condições fixadas: modo *full scan* (cromatograma com os íons totais-TIC) e cromatograma do íon reconstituído (RIC). Temperatura da fonte de íons: 200°C e da linha de transferência: 275°C. Volume de injeção: 1 µL, modo de injeção *splitless* e tempo de *splitless* 1 min.

Avaliação de sistemas de derivação

Foram testados três tipos de derivação: siliilação com trimetilsilimidazol (TMSI), fluoroacetilação com anidrido trifluoroacético (TFAA) e com anidrido pentafluoropropiônico (PFPA).

Derivação com trimetilsililimidazol (TMSI): de acordo com Tanaka et al.²³, foram adicionados 200 µL da mistura de n-trimetilsililimidazol (TMSI), trimetilclorosilano e acetato de etila (1:0,2:9). Após 20 min em temperatura ambiente (cerca de 25°C), adicionou-se 2800 µL de acetato de etila, à mistura. Após homogeneização realizou-se injeção de 1 µL no cromatógrafo.

Derivação com anidrido pentafluoropropiônico (PFFA): de acordo com Solfrizzo (1997) (comunicação pessoal) foi adicionado 1 mL de benzeno ao resíduo, homogeneizado e a mistura evaporada sob fluxo de nitrogênio. Ao resíduo foram adicionados 500 µL da mistura tolueno-acetonitrila (85+15, v/v) contendo imidazol 0,4 M, seguido de 100 µL de PFFA. As soluções foram misturadas e derivadas por 1h a 60°C. Em seguida a solução foi resfriada até cerca de 25°C e foram adicionados 500 µL de hexano. A fase orgânica foi lavada com solução de bicarbonato de sódio 5% e em seguida com água. A fase aquosa foi removida e a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro. A fase orgânica foi transferida para outro frasco seco e 1 µL desta fase foi injetado no cromatógrafo.

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

Reação em presença de 4-dimetil aminopiridina (DMPA): foram adicionados 1mL de solução de DMPA, 1,5 mg/mL da mistura tolueno: acetonitrila (95+5, v/v) e 200 µL de TFAA. A derivação se deu a 60°C por 30min. Após atingir temperatura ambiente, foi adicionado 1mL de solução de KH₂PO₄ 5%. O frasco fechado foi homogeneizado. Após a separação das camadas, a camada superior foi transferida para um segundo frasco contendo 1mL de KH₂PO₄ 5%. Após nova agitação, a fase superior foi transferida para frasco limpo e foi injetado 1 µL no cromatógrafo.

Reação em presença de bicarbonato de sódio: de acordo com Schwadorf e Muller²¹ e Schollenberger et al.²⁰ foi adicionado 1 mL de metanol, com breve sonificação, para garantir ausência de umidade, e evaporado a 40°C. Ao resíduo foram adicionados 200 µL de TFAA e cerca de 20mg de bicarbonato de sódio. O frasco foi fechado, agitado e levado a 80°C por 30 min. Após esta etapa, o frasco foi aberto e evaporado até securo. Ao resíduo foram adicionados 100 µL de tolueno e em seguida foram acrescentados 400 µL de água. Após leve agitação, a fase superior de tolueno foi transferida para outro frasco e foram adicionados cerca de 5-10mg de sulfato de sódio anidro. Após cerca de 15 min, a fase de tolueno foi transferida para outro frasco seco e 1µL foi injetado no cromatógrafo.

Avaliação de padrão interno

Foram testados o éster metílico do ácido araquídico, utilizado por Furlong e Valente Soares³ e Oliveira¹², e alfa-cloralose, recomendado por Solfrizzo (1997) (comunicação pessoal), Langseth e Rundberget⁷ e Schothorst e Jekel¹⁹.

Avaliação de sistema de extração e limpeza

Teste do sistema de extração e limpeza de Oliveira e Valente Soares¹³ utilizando coluna MycoSep 225: extração de 50g de

amostra foi executada com 270mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4% aquoso, por 5 min em liquidificador. Do extrato filtrado foi tomada uma alíquota de 150 mL para clarificação com sulfato de amônio 30% aquoso. Após clarificação e filtração foi tomada outra alíquota de 150 mL a qual foi transferida para um funil de separação já contendo 150 mL de água destilada. Duas partições com 15 mL de diclorometano foram realizadas. As fases orgânicas foram reunidas e daí foram retirados 15 mL, que foi levado à securo a 50°C sob corrente de nitrogênio. O resíduo foi levado a uma segunda etapa de limpeza em uma coluna MycoSep 225. O resíduo seco foi redissolvido em 8 mL da mistura acetonitrila:água (84:16,v/v) e aplicado na coluna. Foram coletados 4mL do eluato e evaporados a 80°C. O extrato seco foi submetido à derivação.

Teste do sistema de extração e limpeza usando coluna MycoSep 225: a 25g da amostra triturada e homogeneizada foram adicionados 100mL da mistura de acetonitrila/água (84+16, v/v) e colocados em agitação em liquidificador por 5 min. Após decantação da mistura foi colhida uma alíquota de cerca de 6-8 mL para um tubo de vidro. A coluna MycoSep foi inserida como um êmbolo neste tubo. Uma alíquota de 4 mL do extrato limpo foi colhida e transferida para um frasco âmbar onde foi evaporada à securo. A seguir foi executada a derivação.

Teste de extração usando concentração da amostra antes da coluna MycoSep 225: com o intuito de aumentar a sensibilidade do método foi testada uma etapa de concentração antes da limpeza na coluna. Assim após extração descrita em 7.2 foram retiradas alíquotas de 50, 30 e 20 mL que foram evaporadas a 60°C até cerca de 5mL. As alíquotas tiveram o volume completado para 8 mL com acetonitrila/água (84+16, v/v). E a limpeza foi realizada com coluna MycoSep 225. Foram retirados 4 mL para frasco âmbar e executada a derivação com TFAA.

Teste de extração usando coluna MycoSep 227: idem como em 7.2. utilizando coluna MycoSep 227, versão da 225 com o dobro da quantidade de recheio.

Validação intralaboratorial

Os testes de recuperação, repetitividade e limites de detecção e quantificação foram conduzidos em amostras, livres de tricotecnos, artificialmente contaminadas com 0,5 µg/g de padrão de cada tricoteceno estudado (DON, NIV, DAS, T2 e HT2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Escolha do melhor agente de derivação e das melhores condições de derivação

A silição é um processo de derivação utilizado principalmente para tricotecnos do grupo B, como DON e NIV¹¹, neste caso tricotecnos dos grupos A e B foram derivados, porém T2 e HT2 ficaram muito próximos, não houve resolução para estes tricotecnos do grupo A.

A silição traz uma vantagem que é a maior estabilidade dos derivados, que podem ser estocados por pelo menos dez

dias a -18°C , porém, o excesso de reagente pode danificar a coluna e podem aparecer picos duplos no cromatograma (derivação incompleta)¹⁴ (Figura 1).

A pentafluoroacetilação gerou cromatogramas com muito ruído e linha de base instável. Além disso, a sensibilidade foi pequena, não sendo possível calcular a recuperação. Desta forma este processo foi descartado.

Dois métodos de trifluoroacetilação foram testados: o de Armstrong et al.¹ e de Schwadorf e Muller²¹ modificado por Schollenberger et al.²⁰. A trifluoroacetilação de forma geral gerou cromatogramas mais limpos, tricotecenos mais bem resolvidos e com maior sensibilidade inclusive perante a sililação. A trifluoroacetilação segundo Schwadorf e Muller²¹ quando comparada à utilizada por Armstrong et al.¹ envolve menos etapas e, portanto, está menos sujeita a perdas na etapa final quando se trabalha com volumes menores que 100 μL . Com trifluoroacetilação todos os tricotecenos foram obtidos bem resolvidos (Figura 2). Os fragmentos mais característicos obtidos estão na Tabela 1.

Alguns dos fragmentos observados na Tabela 1 se repetem nos vários tricotecenos por se tratarem de substâncias

semelhantes. Além disso, o processo de fragmentação usado, que foi o impacto de elétrons, gera muitos fragmentos pequenos sendo que muitas vezes nem se observa o íon molecular. Fragmentos menores podem levar este processo a estar mais sujeito às interferências de contaminantes e ao efeito matriz. Estes fragmentos são pouco confiáveis para identificação e podem ser ocultados numa quantificação. Usualmente os fragmentos de massa maiores são mais característicos.

A trifluoroacetilação trouxe derivados cujos fragmentos apresentaram melhores relações sinal/ruído e os tricotecenos bem resolvidos.

Outro parâmetro avaliado foi a sensibilidade (s) do detector com relação a cada tricoteceno. Como o detector utilizado responde a massa, definiu-se s como a área do pico cromatográfico integrado/massa do analito que passa pelo detector. Desta forma observou-se que (Tabela 2) o detector apresentava maior sensibilidade para os derivados-TFAA do que os derivados-TMSI. A sensibilidade para DON-TFA foi cerca de 1,7 e para NIV-TFA e T2-TFA praticamente o dobro do que seus derivados sililados. Para HT2, a sensibilidade foi quase

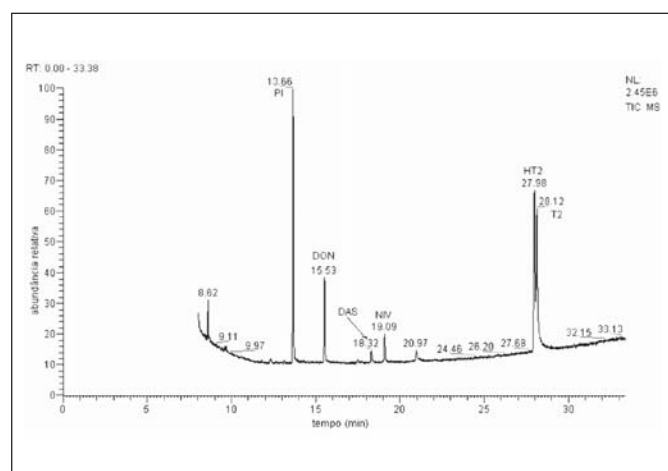


Figura 1. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 2,4 ng de desoxinivalenol (DON), 2,1 ng de nivalenol (NIV), 2,2 ng de diacetoxiscirpenol (DAS), 22 ng de toxina HT-2 (HT2) e 10 ng de toxina T-2 (T2), todos sililados, utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25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

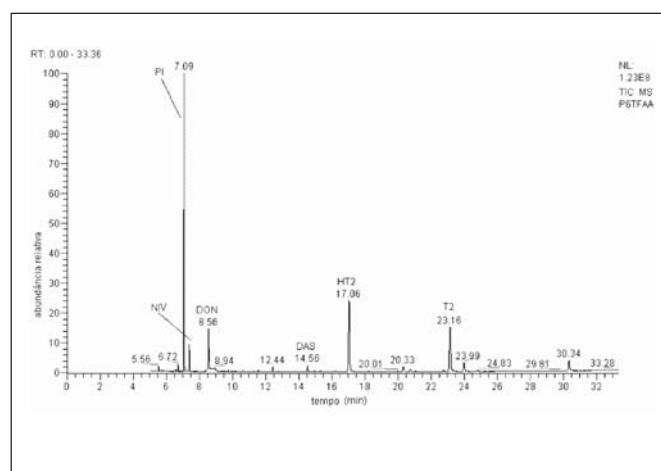


Figura 2. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 4 ng de cada um dos tricotecenos trifluoroacetilados: desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxina T-2 (T2), toxina HT-2 (HT-2) e alfa-cloralose (PI), utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25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

Tabela 1. Massas características dos tricotecenos de acordo com a derivação realizada.

Tricotecenos	Fragmentos m/z considerados mais característicos	
	com sililação	com fluoracetilação
DON	73, 207, 235, 259, 333, 393, 422, 512	117, 145, 194, 205, 231, 259, 373, 470, 584
NIV	73, 191, 231, 261, 289, 349, 379, 482, 510, 585	194, 229, 257, 359, 371, 485, 696
DAS	73, 124, 159, 197, 244, 272, 290, 350, 378	91, 105, 124, 201, 229, 296, 359, 329, 402
T2	73, 122, 185, 244, 272, 290, 350, 436	121, 138, 180, 205, 227, 327, 401, 418, 462
HT2	73, 157, 185, 203, 245, 275, 347, 466	121, 138, 180, 205, 341, 455, 472

DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol, HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2

cinco vezes maior e para DAS a sensibilidade foi praticamente semelhante com relação aos derivados sililados.

Escolha do padrão interno

Na escolha do melhor padrão interno levou-se em consideração o fato de que o éster metílico do ácido araquídico não era derivado como os tricotecenos, ele era simplesmente adicionado no extrato final com o intuito de controlar distorções do volume de injeção. Notou-se que cumpriu sua função com quatro dos tricotecenos, porém, seu tempo de retenção coincidia exatamente com o do DON. Já o alfa-cloralose funcionou para todas as derivações testadas com pequenos ajustes na programação de temperatura da coluna, desta forma também controlando a etapa de derivação uma vez que sua quantidade é sempre constante. Langseth e Rundberget⁷ já haviam verificado que esta substância preenchia todos os requisitos de um padrão interno tanto para derivados sililados como para os pentafluoroacetilados e provavelmente funcionaria para os heptafluoroacetilados. Neste estudo verificou-se que também pode ser usado para os trifluoroacetilados. O alfa-cloralose apresentou tempo de retenção de 13,63 min quando sililado e de 7,17 min quando trifluoroacetilado. Seus fragmentos mais característicos foram 73, 147, 191, 205, 217, 245 com a sililação e 81, 109, 223, 251, 319, 479 com a fluoracetilação.

Confirmação dos resultados

Para confirmação dos resultados geralmente três íons são considerados suficientes para confirmação de um espectro de impacto de elétrons^{16,30}. Neste trabalho a identidade dos tricotecenos foi determinada comparando-se tempos de retenção, espectros de massas e presença de cinco a seis fragmentos de massas mais característicos.

Na Tabela 3 estão os fragmentos de massas selecionados^{10,11} para detecção e quantificação dos tricotecenos derivados tanto por sililação quanto por fluoroacetilação.

Para a quantificação foram utilizados de cinco a seis íons/fragmentos para cada tricoteceno, conforme Tabela 3, a fim de se diminuir oscilações observadas, provavelmente originárias da própria estrutura do equipamento *ion trap* (armadilha de íons).

Avaliação de sistema de extração e limpeza

Nesta etapa foram utilizadas amostras de milho artificialmente contaminadas com 0,5 µg/g de DON, NIV, DAS, T2 e HT2 e foram observadas a recuperação dos tricotecenos e aspecto dos cromatogramas (eliminação de ruído e de interferentes). A técnica de extração testada descrita por Furlong e Valente Soares³ modificada por Oliveira e Valente Soares¹³ acrescida da limpeza em coluna MycoSep 225 não apresentou nenhuma recuperação, de nenhum dos tricotecenos, para as matrizes farinha de milho, milho verde em lata e sêmola. As amostras de fubá mostraram recuperação para DON (150%), DAS (32%), HT2 (133%), e T2 (190%). Para a canjica e flocos de milho, houve recuperação de DON (116% e 83%, respectivamente) e T2 (30% e 84%, respectivamente), todos valores médios de duas análises. NIV não foi recuperado em nenhum grau e em nenhuma das amostras. Devido a esta incapacidade de recuperar NIV e DAS e as recuperações de DON, HT2 e T2 em todos os tipos de amostras serem inadequadas, este sistema de extração foi descartado.

No teste do sistema de extração e limpeza usando coluna MycoSep 225, com concentração antes de limpeza em coluna MycoSep 225, foram empregadas amostras de canjica, fubá, milho em lata, flocos e farinha de milho. A concentração teve o intuito de aumentar a quantidade de amostra no extrato final, consequentemente aumentando a sensibilidade do método. Porém não houve recuperação para NIV e DAS na concentração de alíquota de 50 mL e para DON, HT2 e T2 as recuperações foram abaixo de 20%. Para alíquotas de 20 e 30mL, após concentração, as recuperações foram especialmente elevadas, acima de 200%, para DAS, HT2 e T2. Para DON e NIV, ocorreu o oposto, as recuperações foram baixas, menos de 10%, com exceção da alíquota de 20mL para amostras de canjica, cujos valores médios de recuperação para DON, NIV, DAS e HT2 foram 61, 77, 200 e 118% respectivamente. A recuperação para T2 ficou abaixo de 10%. O efeito matriz foi decisivo, mesmo usando a reconstituição do cromatograma apenas com os íons característicos das micotoxinas. É provável que muitos destes íons também fizessem parte da fragmentação dos extratos de amostra. Estes resultados mostraram que a coluna MycoSep não era apropriada para limpeza de extratos concentrados de nenhuma forma.

Tabela 2. Sensibilidade (relação área integrada / massa) para cada um dos tricotecenos derivados por sililação e trifluoroacetilação

TRICOTECENOS	SENSIBILIDADE (C.s/ ng) *	
	derivados sililados **	derivados trifluoroacetilados **
DON	1,06 x 10 ⁶	1,77 x 10 ⁶
NIV	0,44 x 10 ⁶	0,92 x 10 ⁶
DAS	0,17 x 10 ⁶	0,19 x 10 ⁶
HT2	0,29 x 10 ⁶	1,39 x 10 ⁶
T2	0,43 x 10 ⁶	0,93 x 10 ⁶

DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol, HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2

* cálculo baseado na concentração de padrões 6 ng/µL

** valores médios

Tabela 3. Fragmentos m/z derivados mais freqüentemente usados na quantificação e selecionados para este trabalho

Tricotecenos e PI	Fragmentos m/z derivados					Referências
Alfa-cloralose (PI)						
Sililação	73	191	205	217	245	
Fluoroacetilação	81	109	223	251	319	
DON						
Sililação	73	235	393	422	512	Mirocha et al. 1986
Fluoroacetilação	117	145	231	259	584*	Mclachlan et al.1992
NIV						
sililação	73	191	261	289	510	Mirocha et al. 1986
Fluoroacetilação	229	257	359	371	696*	Mclachlan et al.1992
DAS						
sililação	73	244	290	350	378	Mirocha et al. 1986
fluoroacetilação	91	124	229	329	402	Mclachlan et al.1992
HT2						
sililação	73	185	157	203	466	Mirocha et al. 1986
Fluoroacetilação	121	138	180	341	455	Mclachlan et al.1992
T2						
Sililação	73	185	244	290	350	Mirocha et al. 1986
Fluoroacetilação	121	138	180	227	327 e 401	Mclachlan et al.1992

DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol, HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2

* íon molecular

PI = padrão interno

O mesmo método executado sem nenhuma concentração antes da limpeza com coluna MycoSep 225 apresentou cromatogramas com alguns picos interferentes, porém, nenhum em tempo de retenção que pudesse interferir na detecção e quantificação dos tricotecenos ou do padrão interno. Porém não se obteve recuperação para NIV em canjica (Tabela 4). A Figura 3 traz os cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de farinha de milho sem contaminação e contaminada artificialmente com 0,5 µg/g de cada tricoteceno testado.

O teste de extração e purificação foi também efetuado com a coluna MycoSep 227, que tem o dobro do material de recheio da 225, portanto destinada à amostras mais complexas. Os valores obtidos nos testes com adição de 0,5µg/g de cada tricoteceno nas amostras, com cinco repetições, estão na Tabela 4.

Observando os dados da Tabela 4 verifica-se que de forma geral os resultados estão dentro da faixa aceitável estabelecida por Horwitz et al.⁴ para análise de traços (ppb), de 70 a 120%. Usando a coluna 227 conseguiu-se recuperar NIV de canjica, o que não havia sido possível com a coluna 225. Porém, continuou impossível recuperar DON e NIV das amostras de milho verde em lata, inclusive porque há uma grande região no início do cromatograma totalmente coberta pelos co-extrativos, que encobrem não apenas os tricotecenos que possuem os tempos de retenção menores, mas também o PI. Neste caso para calcular a concentração de DAS, HT2 e T2 foi necessário usar calibração externa.

De forma geral a coluna 227 foi considerada a mais adequada para limpeza dos extratos das amostras de milho e produtos de milho.

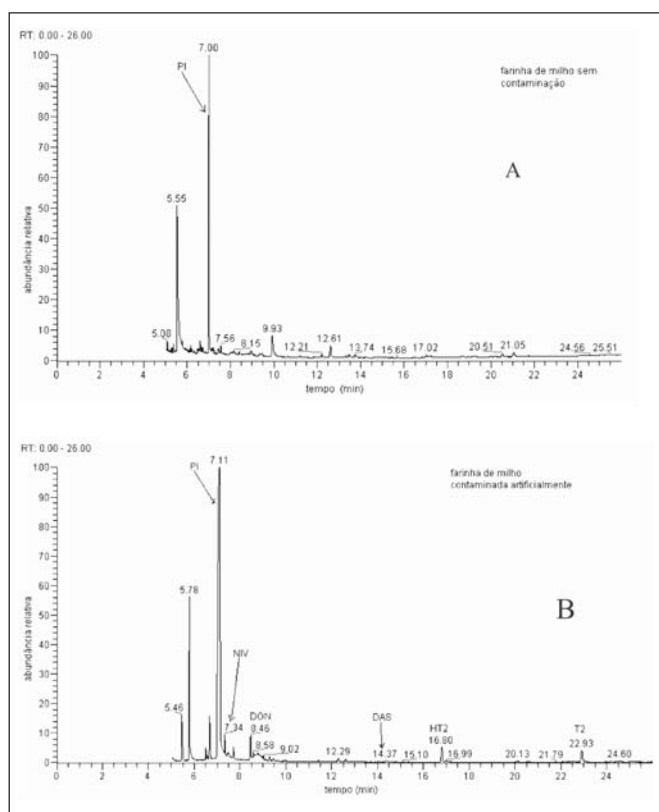


Figura 3. Cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de farinha de milho com alfa-cloralose (PI) (A) sem contaminação e (B) contaminada artificialmente com 0,5 µg/g de desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS) e toxinas T-2 (T2) e HT-2 (HT2). Amostra extraída e limpa por método usando 4 mL do extrato concentrado antes de passagem pela coluna MycoSep 225 e submetida à derivação com TFAA.

Validação intralaboratorial da metodologia escolhida

A recuperação e a repetitividade foram realizadas cinco repetições em amostras de milho e produto de milho artificialmente contaminadas com 0,5 µg/g de cada tricoteceno, DON, NIV, DAS, HT2 e T2. As amostras contaminadas foram extraídas com acetonitrila + água (84+16,v/v) e seus extratos passados pelas colunas MycoSep 227. Os extratos limpos foram derivados com TFAA/bicarbonato de sódio sólido.

As recuperações (Tabela 5) variaram de 83,3 a 113,3 % para DON, 84,6 a 114,5% para NIV, 52,1 a 122,7% para DAS, 71,1 a 95,9 % para T2 e de 81,8 a 155,4 % para HT2.

A repetitividade do método mostrou desvios padrão relativos (DPR) variados de acordo com o tipo de amostra e o tricoteceno avaliado, variando de 4,5 a 18,1 para DON, 2,5 a 15,4 para NIV, 3,4 a 48,1 para DAS, 3,1 a 14,4 para HT2 e de 6,4 a 47,3 para T2. As curvas de calibração interna foram lineares de 0,8 a 10,0 ng/µL para DON e NIV, de 0,8 a 6,0 ng/µL para DAS, de 0,8 a 20,0 ng/µL para T2 e de 0,8 a 35,0 ng/µL para HT2. Foram traçadas curvas de calibração externa para utilização nas amostras de milho verde em lata. As curvas de calibração externa foram lineares de 0,8 a 10,0 ng/µL DON, DAS, HT2 e T2 e de 0,8 a 8,0 ng/µL para NIV.

Os resultados das recuperações e dos limites de detecção e quantificação em amostras de produtos de milho foram superiores aos obtidos nas amostras de milho em grão. O efeito matriz foi muito grande. Segundo Plattner et al.¹⁶ na maioria dos casos é o ruído químico, e não a sensibilidade, o fator limitante na análise de uma micotoxina, em particular num sistema CGEM. Ruído químico é considerado como os sinais interferentes produzidos por constituintes estranhos da amostra.

Os limites de detecção foram calculados baseando-se nas recomendações de Taylor²⁶, sendo verificadas as concentrações que originaram picos com um sinal pelo menos três vezes o DPR, e que o pico cromatográfico do tricoteceno gerasse seu espectro coincidente nos cinco fragmentos selecionados, assegurando desta forma a comprovação de sua identidade. Os limites de quantificação foram considerados como quinze vezes o desvio padrão relativo, os resultados para as diferentes matrizes estão na Tabela 6.

Os resultados obtidos quando comparados aos da literatura para matrizes como milho apresentam certa proximidade. Rosen e Rosen¹⁸ obtiveram recuperação variando de 80 a 100% e DPR entre 1,6 e 14,2%, usando CGEM com modo SIM. Tanaka et al.²⁵ obteve recuperação de 81 a 92% e DPR de 4,4 a 5,7 também utilizando CGEM com SIM.

Este trabalho utilizou impacto de elétrons (IE) e foi aplicada a técnica de reconstituição de íons do cromatograma. Os altos valores obtidos em algumas recuperações podem ser devidos a uma coincidência dos íons escolhidos para RIC também fazerem parte da amostra. Além disso, é importante dizer que no instrumento com íon trap pode ocorrer auto-ionização dos íons, que pode prejudicar a quantificação, alterando a quantidade de amostra e consequentemente mudar drasticamente a sensibilidade²⁹. Este é um motivo pelo qual equipamentos com íon trap são mais indicados para quantificação com ionização química e não com impacto de elétrons²⁰. Entretanto, este estudo superou, pelo menos em parte, estes problemas e os resultados obtidos se assemelham a outros citados na literatura.

Duas revisões mais recentes, Langseth e Rundberger⁷ e Krska et al.⁶ concluíram que a detecção por espectrometria de

Tabela 4. Valores médios de recuperação (%) de amostras de milho e produtos de milho artificialmente contaminadas (0,5 µg/g) de DON, NIV, DAS, HT2 e T2 usando limpeza com colunas MycoSep 225 e 227.

Amostras	Recuperação*					Coluna usada
	DON	NIV	DAS	HT2	T2	
Canjica	81,0	Nr	75,0	81,0	108,0	225
	105,7	99,2	122,7	115,9	92,9	227
Fubá	86,0	64,0	62,8	105,2	103,9	225
	113,3	112,5	69,4	129,2	88,4	227
Farinha de milho	95,1	68,1	102,6	100,7	118,9	225
	99,8	89,9	83,5	155,4	95,9	227
Quirera	111,0	80,0	69,0	82,0	106,0	225
	83,3	84,8	74,2	102,6	74,5	227
Flocos de milho	140,0	84,0	68,0	124,0	108,0	225
	87,2	86,7	112,3	105,4	71,7	227
Milho em lata	nr	nr	122,0	76,0	124,0	225
	nr	nr	116,8	81,8	71,1	227
Milho em grão	85,4	84,1	109,3	108,4	69,6	225
	86,1	84,6	101,6	89,1	71,1	227

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

Tabela 5. Valores médios de recuperação, desvio padrão e desvio padrão relativo, para DON, NIV, DAS, HT2 e T2 para amostras de produtos de milho, utilizando coluna MycoSep 227

		milho em grão	canjica	flocos de milho	farinha de milho	fubá	quirera	sêmola	milho em lata
DON	%R média*	86,1	105,7	87,2	99,8	113,3	83,3	102,5	nr
	DP	5,6	4,8	11,1	18,1	8,0	4,8	14,8	
	DPR	6,5	4,5	12,7	18,1	7,1	11,5	14,4	
NIV	%R média*	84,6	99,2	86,7	89,9	112,5	84,8	114,5	nr
	DP	2,5	8,2	13,4	12,2	5,5	3,5	5,0	
	DPR	2,9	8,3	15,4	13,6	4,9	4,1	4,4	
DAS	%R média*	101,6	122,7	112,3	83,5	69,4	74,2	52,1	116,8
	DP	11,8	11,8	3,8	20,1	8,3	35,7	9,7	9,9
	DPR	11,6	9,6	3,4	24,1	12,0	48,1	18,7	8,5
HT2	%R média*	89,1	115,9	105,4	155,4	129,2	102,6	140,9	81,8
	DP	12,9	6,1	3,3	16,0	9,9	14,6	8,9	10,2
	DPR	14,4	5,2	3,1	10,3	7,7	14,2	6,3	12,5
T2	%R média*	71,1	92,9	71,7	95,9	88,4	74,5	83,6	71,1
	DP	4,5	18,1	5,0	6,7	11,1	11,9	14,5	33,6
	DPR	6,4	19,5	7,0	7,0	12,5	16,1	17,3	47,3

%Rmédia* = porcentagem de recuperação média de cinco determinações; DPR = desvio padrão relativo; DP = desvio padrão; nr = não recuperado

Tabela 6. Limites de detecção e quantificação (ng/g) de derivados trifluoroacetilados de DON, NIV, DAS, T2e HT2 determinados em milho em grão e produtos de milho por CG-EM

Tricoteceno	DON		NIV		DAS		HT2		T2	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
milho em grão	20	90	10	50	40	180	40	200	20	70
Canjica	20	70	30	120	40	180	20	100	60	300
Quirera	20	70	20	60	120	550	50	220	40	200
flocos de milho	40	170	40	200	20	60	20	50	20	80
farinha de milho	60	300	40	200	60	300	50	250	20	100
Fubá	30	120	30	90	30	150	30	150	40	170
Sêmola	50	220	20	80	30	150	30	150	50	220
milho verde em lata	nd	nd	nd	nd	30	150	30	150	100	500

NOTA: valores médios de 5 repetições; nd = não determinado; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação; DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; T2 = toxina T-2; HT2 = toxina HT-2; DAS = diacetoxiscirpenol

massas é essencial para obtenção de resultados confiáveis a respeito de tricotecenos presentes em pequenas concentrações. E há uma vantagem neste método que é a determinação simultânea de vários tricotecenos.

CONCLUSÕES

Extração utilizando acetonitrila e água (84 + 16, v/v) e limpeza com coluna MycoSep 227 mostrou-se a mais adequada para determinação dos tricotecenos DON, NIV, DAS, HT2 e T2 em milho e produtos de milho por cromatografia a gás associada à espectrometria de massas. Em termos de derivação o uso de

anidrido trifluoroacético em presença de bicarbonato de sódio sólido produziu resultados mais sensíveis, menos interferentes e boa estabilidade.

Os cromatogramas foram reconstituídos com os fragmentos mais característicos para reduzir o efeito matriz com bons resultados. Para quantificação, foi empregada a padronização interna para a maioria das amostras, e padronização externa para amostras de milho verde enlatado.

As recuperações variaram para os diversos produtos de milho de 83,3 a 113,3 % para DON, 84,6 a 114,5% para NIV, 52,1 a 122,7% para DAS, 71,1 a 95,9 % para T2 e de 81,8 a 155,4 % para HT2. Os limites de detecção variaram de 20 a 50 ng/g para DON, de 10 a 40 ng/g para NIV, de 30 a 120 ng/g para DAS, de 20 a 50

para HT2 e de 20 a 100 para T2. Os limites de quantificação variaram de 70 a 300 ng/g para DON, de 50 a 200 ng/g para NIV, de 60 a 300 ng/g para DAS, de 50 a 250 ng/g para HT2 e de 70 a 500 ng/g para T2.

A repetitividade do método mostrou desvios padrão relativos (DPR) variados de acordo com o tipo de amostra e de tricoteceno, variando de 4,5 a 18,1 para DON, 2,5 a 15,4 para NIV, 3,4 a 48,1 para DAS, 3,1 a 14,4 para HT2 e de 6,4 a 47,3 para T2. As amostras que mostraram maiores valores de DPR e de limites de detecção e quantificação foram aquelas que apresentaram maior quantidade de co-extrativos nos seus cromatogramas, em especial milho verde em lata e farinha de milho.

AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa concedido.

REFERÊNCIAS

1. Armstrong, J.F. et al. Determination of vomitoxin and other trichothecene mycotoxins in feeds by GC/ion trap MS with acetonitrile chemical ionization. Comunicação pessoal referente a poster apresentado em Montreal/ Canada no AOAC Meeting de 1998.
2. Furlong, E.B. **Tricotecenos em trigo: um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo.** Campinas, 1992. 120p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
3. Furlong, E.B.; Valente Soares, L.M. Gas chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. **JAOAC Int.**, 78 (2): 386-90, 1995.
4. Horwitz, W.; Kamps, L.R.; Boyder, K.W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 63 (6): 1344-54, 1980.
5. Kientz, C.E.; Verweij, A. Trimethylsilylation and trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silica capillary columns. **J. Chromatogr.**, 355: 229-40, 1986.
6. Krska, R. Performance of modern samples preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. **J. Chromatogr. A**, 815: 49-57, 1998.
7. Langseth, W.; Rundberget, T. Instrumental methods for determination of non macrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures (review). **J. Chromatogr. A**, 815: 103-21, 1998.
8. Marochi, M.A., Valente Soares, L.M. Metodologia para determinação de tricotecenos e zearalenona em grãos. **Bol. SBCTA**, 27(1):1-8, 1993
9. Marochi, M.A.; Valente Soares, L.M.; Furlani, R.P.Z. Testes confirmatórios para tricotecenos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56 (2): 17-20, 1996.
10. McLachlan, A. et al. Production of trichothecene mycotoxins by Australian *Fusarium* species. **Food Addit. Contam.**, 9(6): 631-7, 1992.
11. Mirocha, C.J. et al. Mass spectra of selected trichothecenes. In: **Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins**; Cole, R.J., Ed.; Academic Press: New York, 1986; pp.53-392.
12. Oliveira, A.Q. Tricotecenos em milho: uma avaliação de métodos analíticos e da incidência em milho pipoca. 2001. 132f. Dissertação (mestrado)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.
13. Oliveira, A.Q.; Valente Soares, L.M. Avaliação de métodos para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2): 129-34, 2001.
14. Onji, Y. et al. Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 815: 59-65, 1998.
15. Pascale, M.; Haidukowski, M.; Visconti, A. Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthroylnitrile. **J. Chromatogr. A**, 989(2): 257-64, 2003.
16. Plattner, R.D.; Beremand, M.N.; Powell, R.G. Analysis of trichothecene mycotoxins by mass spectrometry and tandem mass spectrometry. **Tetrahedron**, 45(8):2251-62, 1989.
17. Romer, T.R. Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxin in food and feeds. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 69(4): 599-703, 1986
18. Rosen, R.T.; Rosen, J.D. Quantification and confirmation of four *Fusarium* mycotoxins in corn by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. **J. Chromatogr.**, 283: 223-30, 1984.
19. Schothorst, R.C.; Jekel, A.A. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionization detection. **Food Chem.**, 73: 111-7, 2001.
20. Schollenberger, M. et al. Determination of eight trichothecenes by gas-chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. **J. Chromatogr. A**, 815: 123-32, 1998.
21. Schwadorf, K.; Müller, H-M. Determination of trichothecenes in cereals by gas-chromatography with ion-trap detection. **Chromatographia**, 32 (3/4): 137-42, 1991
22. Snyder, A.P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecenes mycotoxins. **J. Food Prot.**, 49(7):544-69, 1986.
23. Tanaka, T. et al. A survey of the occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in foodstuffs and health foods in Japan. **Food Addit. Contam.**, 2: 259-65, 1985.
24. Tanaka, T. et al. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. **J. Agric. Food Chem.**, 36: 979-83, 1988.
25. Tanaka, T. et al. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 882: 23-8, 2000.
26. Taylor, J.K. **Quality Assurance of Chemical Measurements.** Chelsea/EUA: Lewis Publishers, Inc. 1987. 329p.
27. Ueno, Y. Trichothecene: chemical, biological and toxicological aspects. In: UENO, Y. (Ed.). **Development in Food Science.** Tokyo: Elsevier, v.4, 1983.
28. Ueno, Y. Trichothecenes as environmental toxicants. **Review in Environmental Toxicology** 2, p.303-41, 1986.
29. Vékey, K. Mass Spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **J. Chromatogr. A**, 921: 227-36, 2001.
30. Webb, K.; Sargent, M. The reliability of mass spec. for identification purposes. **VAM Bull.**, 22:12-4, 2000.
31. World Health Organization. Environmental Health Criteria 105. **Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot.** IPCS (International Programme on Chemical Safety). Geneva, 1990. Trichothecenes cap. 2, 1990, p: 71-164.