



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Alimentos e Nutrição

**FUMONISINA B₁ EM ARROZ: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO
ANALÍTICO, VALIDAÇÃO E OCORRÊNCIA.**

Mateus Henrique Petrarca

Farmacêutico-Bioquímico

Araraquara, SP, 18 de Janeiro de 2012.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Alimentos e Nutrição

**FUMONISINA B₁ EM ARROZ: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO
ANALÍTICO, VALIDAÇÃO E OCORRÊNCIA.**

Mateus Henrique Petrarca

Farmacêutico-Bioquímico

Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Sylos

Orientadora

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Araraquara, SP, 18 de Janeiro de 2012.

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P493f Petrarca, Mateus Henrique
 Fumonisina B₁ em arroz: desenvolvimento de método analítico, validação
e ocorrência / Mateus Henrique Petrarca. – Araraquara, 2012
 155 f. + il.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição
 Orientador: Célia Maria de Sylos

 1. Arroz. 2. Fumonisina. B₁. 3. Validação intralaboratorial . 4. CLAE. 5.
Planejamento fatorial. I. Sylos, Célia Maria, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Sylos

Dr^a. Myrna Sabino

Prof^a. Dr^a. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato

Dr^a. Ana Lúcia Martiniano Nasser

Prof^a. Dr^a. Jaqueline Garda Buffon

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Milton e Nereide,
pelo incentivo, compreensão e sincero amor.*

AGRADECIMENTOS

Imensamente grato a Deus e a Nossa Senhora do Perpétuo Socorro por mais esta realização em minha vida e, pela força e conforto nos momentos de maior dificuldade.

À Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Sylos pela oportunidade de trabalhar com micotoxinas e pelos ensinamentos que sempre levarei comigo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de estudos e pelo suporte financeiro.

Ao Laboratório de Pesquisa em Probióticos – FCFAr/UNESP pela concessão do uso do cromatógrafo a líquido de alta eficiência.

À Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Rodrigues – FEA/UNICAMP o meu especial agradecimento, pela orientação e oportunidade de aprender a metodologia de planejamento fatorial.

Aos funcionários da Biblioteca – FCFAr/UNESP, Ana Cristina, Irani, Rita e Sônia, pela especial atenção.

Aos professores Dr. José Paschoal Batistuti e Dr^a. Magali Monteiro pelas contribuições para minha formação acadêmica.

À Elizene, Maraiza e Roseli pelo aprendizado e auxílio na realização do trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora pelas sugestões.

Aos colegas conquistados durante o Mestrado, Laura, Lilian e Guilherme, pelo companherismo.

E em especial aos amigos, Bruno, Laurene, Leonardo, Livia, Mariana, Nana e Paula, que fizeram de cada dia momentos mais que especiais.

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram avaliar a influência do pH, tempo e temperatura sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-*orto*-ftaldialdeído, desenvolver e validar um método analítico para a determinação de fumonisina B₁ em arroz, como também avaliar a ocorrência de fumonisina B₁ em amostras de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral comercializadas no município de Araraquara, SP. Na otimização das condições cromatográficas, verificou-se que os parâmetros experimentais pH, tempo e temperatura influenciaram significativamente na estabilidade do derivado fumonisina B₁-*orto*-ftaldialdeído. A partir de planejamento fatorial – delineamentos de Plackett & Burman e Composto Central Rotacional, e com referência no procedimento *QuEChERS*, foi possível desenvolver um método analítico para a determinação de fumonisina B₁ em arroz. Um método de fácil execução, economicamente viável, rápido e com menor geração de resíduos orgânicos. Os parâmetros de desempenho do método analítico indicaram seletividade para a micotoxina fumonisina B₁, linearidade, efeito de matriz significativo, exatidão e precisão, com limite de detecção de 50 µg.kg⁻¹ e limite de quantificação de 100 µg.kg⁻¹. O método apresentou porcentagens de recuperação de 100,48, 104,97, 87,60 e 91,76% para o arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, respectivamente. Verificou-se contaminação por fumonisina B₁ em aproximadamente 12% do total de 51 amostras analisadas. Das 20 amostras de arroz polido, apenas uma apresentou contaminação por fumonisina B₁, com nível de 258,69 µg.kg⁻¹. Verificou-se que das 10 amostras de arroz parboilizado polido analisadas, duas apresentaram contaminação por fumonisina B₁, com níveis entre 109,36 e 162,99 µg.kg⁻¹, o que representou uma contaminação em 20% das amostras de arroz parboilizado polido analisadas. Detectou-se a presença de fumonisina B₁ em apenas uma amostra de arroz integral e uma de parboilizado integral, cujos níveis quantificados foram de 111,24 e 110,63 µg.kg⁻¹, respectivamente. Os resultados indicaram uma baixa contaminação do arroz por fumonisina B₁ e a necessidade de mais estudos sobre a ocorrência desta micotoxina em arroz, a fim de corroborarem sobre a incidência da micotoxina no arroz brasileiro.

Palavras-chave: Arroz; Fumonisina B₁; Validação Intralaboratorial; CLAE, Planejamento fatorial.

ABSTRACT

The aims of the study were to evaluate the influence of pH, time and temperature on stability of the fumonisin B₁-*ortho*-phthaldialdehyde derivative, develop and validate an analytical method for determination of the fumonisin B₁ in rice, as also evaluate the occurrence of fumonisin B₁ in polished, polished parboiled, whole and whole parboiled rice samples, marketed in Araraquara, SP. In chromatographic conditions optimizing, observed that experimental parameters pH, time and temperature significantly influenced on stability of the fumonisin B₁-*ortho*-phthaldialdehyde derivative. From Palckett & Burman and Rotational Central Composite designs was obtained an analytical method for determination of fumonisin B₁ in rice. An easy, cheap and fast method, with less generation of organic residuals. The performance parameters of the analytical method showed selectivity for the mycotoxin fumonisin B₁, linearity, significant matrix effect, accuracy and precision, with detection limit of 50 µg.kg⁻¹ and limit of quantification of 100 µg.kg⁻¹. The method recovery was 100.48, 104.97, 87.60 and 91.76% for polished, polished parboiled, whole and whole parboiled rice samples, respectively. The contamination by fumonisin B₁ was observed in approximately 12% of 51 samples analyzed. Contamination by fumonisin B₁ was observed in approximately 12% of 51 samples analyzed. Only one polished rice sample showed contamination by fumonisin B₁ whose level was of 258.69 µg.kg⁻¹. Among the total of polished parboiled rice samples analyzed, two samples were contaminated by fumonisin B₁, with levels between 109.36 and 162.99 µg.kg⁻¹, indicating a contamination by fumonisin B₁ in 20% of polished parboiled rice samples analyzed. The fumonisin B₁ was detected in one whole rice sample, whose level was 111.24 µg.kg⁻¹. Only in a sample of whole parboiled rice was quantified fumonisin B₁, whose level was of 110.63 µg.kg⁻¹. The results indicated a low contamination of rice by fumonisin B₁, and the necessity of more studies on the occurrence of the fumonisin B₁ in the rice to confirm the incidence of mycotoxin in Brazilian rice.

Keywords: Rice; Fumonisin B₁; In-house Validation; HPLC; Factorial design.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Estrutura química da micotoxina fumonisina B₁.....25

Figura 2 – Similaridade estrutural entre as moléculas de fumonisina B₁, esfingosina e esfinganina.....26

Figura 3 – Reação química entre o grupo amina primária da fumonisina B₁ e *orto-ftaldialdeído* (OPA) na presença de 2-mercaptoetanol.....32

CAPÍTULO II

Figura 1 – Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-*orto-ftaldialdeído* em diferentes condições de pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M.....53

Figura 2 – Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-*orto-ftaldialdeído* em diferentes tempos da reação de derivatização.....55

Figura 3 – Cromatograma característico da separação e detecção do derivado fumonisina B₁-*orto-ftaldialdeído*.....57

Figura 4 – Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-*orto-ftaldialdeído* em diferentes condições de pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M.....58

Figura 5 – Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-*orto-ftaldialdeído* em diferentes temperaturas da coluna cromatográfica.....60

CAPÍTULO III

Figura 1 – Curva de calibração de fumonisina B₁ (500 – 2500 µg.kg⁻¹).....77

Figura 2 – Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo para a porcentagem de recuperação de fumonisina B₁ pelo método.....86

Figura 3 – Superfície de resposta e curva de contorno para a recuperação (%) de fumonisina B₁ em função da concentração de acetonitrila (%) e o volume de ácido acético glacial (mL).....87

Figura 4 – Superfície de resposta e curva de contorno para a recuperação (%) de fumonisina B₁ em função da concentração de acetonitrila (%) e a quantidade de sulfato de sódio anidro (g).....88

Figura 5 – Superfície de resposta e curva de contorno para a recuperação (%) de fumonisina B₁ em função de volume de ácido acético glacial (mL) e a quantidade de sulfato de sódio anidro (g).....89

Figura 6 – Método analítico para a determinação de fumonisina B₁ em arroz.....91

CAPÍTULO IV

Figura 1 – Cromatogramas característicos de extratos de arroz polido.....108

Figura 2 – Cromatogramas característicos de extratos de arroz parboilizado polido....	109
Figura 3 – Cromatogramas característicos de extratos de arroz integral.....	110
Figura 4 – Cromatogramas característicos de extratos de arroz parboilizado integral..	111
Figura 5 – Gráficos dos resíduos de regressão das curvas de fumonisina B ₁ (100 – 2500 µg.kg ⁻¹) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido e parboilizado polido, com os respectivos <i>outliers</i> confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.....	113
Figura 6 – Gráficos dos resíduos de regressão das curvas de fumonisina B ₁ (100 – 2500 µg.kg ⁻¹) em extrato de arroz integral e parboilizado integral, com os respectivos <i>outliers</i> confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.....	114
Figura 7 – Gráficos de probabilidade normal das curvas de fumonisina B ₁ (100 – 2500 µg.kg ⁻¹) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido e parboilizado polido.....	116
Figura 8 – Gráficos de probabilidade normal das curvas de fumonisina B ₁ (100 – 2500 µg.kg ⁻¹) em extrato de arroz integral e parboilizado integral.....	117
Figura 9 – Gráficos de Durbin-Watson das curvas de fumonisina B ₁ (100 – 2500 µg.kg ⁻¹) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido e parboilizado polido.....	119
Figura 10 – Gráficos de Durbin-Watson das curvas de fumonisina B ₁ (100 – 2500 µg.kg ⁻¹) em extrato de arroz integral e parboilizado integral.....	120
Figura 11 – Curvas de calibração de fumonisina B ₁ (100 – 2500 µg.kg ⁻¹) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido e parboilizado polido, com as respectivas equações da reta de regressão linear e coeficientes de determinação (R ²).122	
Figura 12 – Curvas de calibração de fumonisina B ₁ (100 – 2500 µg.kg ⁻¹) em extrato de arroz integral e parboilizado integral, com as respectivas equações da reta de regressão linear e coeficientes de determinação (R ²).....	123
CAPÍTULO V	
Figura 1 – Subgrupos de arroz adquiridos no município de Araraquara, SP.....	139

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Variáveis avaliadas no delineamento de Plackett & Burman e seus respectivos níveis codificados.....	74
Tabela 2 – Matriz do delineamento de Plackett & Burman de 16 ensaios – PB 16.....	74
Tabela 3 – Variáveis avaliadas no Delineamento Composto Central Rotacional e seus respectivos níveis codificados.....	75
Tabela 4 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional.....	75
Tabela 5 – Recuperação (%) de fumonisina B ₁ em cada ensaio do delineamento de Plackett & Burman.....	78
Tabela 6 – Efeito de cada variável na recuperação (%) de fumonisina B ₁	78
Tabela 7 – Recuperação (%) de fumonisina B ₁ em cada ensaio do Delineamento Composto Central Rotacional.....	83
Tabela 8 – Coeficientes de regressão para a recuperação (%) de fumonisina B ₁	84
Tabela 9 – Coeficientes de regressão estatisticamente significativos para a recuperação (%) de fumonisina B ₁	84
Tabela 10 – Análise de variância para a recuperação (%) de fumonisina B ₁	85

CAPÍTULO IV

Tabela 1 – Níveis das variáveis avaliadas, das etapas de extração e purificação, nas condições nominal e de variação.....	106
Tabela 2 – Matriz dos ensaios para a avaliação da robustez do método.....	106
Tabela 3 – Avaliação da linearidade das curvas de calibração de fumonisina B ₁ (100 – 2500 µg.kg ⁻¹) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral.....	124
Tabela 4 – Avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão das curvas de fumonisina B ₁ (100 – 2500 µg.kg ⁻¹) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral.....	125
Tabela 5 – Comparação entre as interseções e inclinações das curvas de fumonisina B ₁ (100 – 2500 µg.kg ⁻¹) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral.....	126
Tabela 6 – Porcentagens de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e de precisão intermediária, em amostras de arroz polido e parboilizado polido.....	129

Tabela 7 – Porcentagens de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e de precisão intermediária, em amostras de arroz integral e parboilizado integral.....	130
--	-----

Tabela 8. Condições e resultados da avaliação da robustez do método analítico.....	131
--	-----

CAPÍTULO V

Tabela 1 – Concentração de fumonisina B ₁ (µg.kg ⁻¹) e teor de umidade (%) em amostras de arroz polido, segundo o Estado de origem.....	143
--	-----

Tabela 2 – Concentração de fumonisina B ₁ (µg.kg ⁻¹) e teor de umidade (%) em amostras de arroz parboilizado polido, segundo o Estado de origem.....	144
---	-----

Tabela 3 – Concentração de fumonisina B ₁ (µg.kg ⁻¹) e teor de umidade (%) em amostras de arroz integral, segundo o Estado de origem.....	145
--	-----

Tabela 4 – Concentração de fumonisina B ₁ (µg.kg ⁻¹) e teor de umidade (%) em amostras de arroz parboilizado integral, segundo o Estado de origem.....	146
---	-----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
1. ARROZ.....	19
1.1. Características Gerais.....	19
1.2. Incidência de Micotoxinas no Arroz Nacional.....	21
2. FUMONISINAS.....	23
2.1. Características Físico-Químicas.....	23
2.2. Mecanismo de Ação e Toxicidade.....	25
2.3. Incidência em Alimentos Nacionais.....	27
2.4. Segurança Alimentar.....	28
2.5. Metodologia Analítica.....	30
3. REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO II – INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS pH, TEMPO e TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DO DERIVADO FUMONISINA B ₁ - ORTO-FTALDIALDEÍDO.....	46
RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAL e MÉTODOS.....	50
2.1. Padrão e Reagentes.....	50
2.2. Solução Padrão de Fumonisia B ₁	50
2.3. Derivatização.....	50
2.4. Análise Cromatográfica.....	50
2.5. Influência do pH, Tempo e Temperatura sobre a Estabilidade do Derivado Fumonisia B ₁ -Orto-Ftaldialdeído.....	51
2.5.1. Reação de Derivatização.....	51

2.5.1.1. pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M.....	51
2.5.1.2. Tempo da reação de derivatização.....	51
2.5.2. Análise Cromatográfica.....	51
2.5.2.1. pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M.....	51
2.5.2.2. Temperatura da coluna cromatográfica.....	52
2.6. Análise Estatística.....	52
2.7. Descontaminação do Material.....	52
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	52
3.1. Reação de Derivatização.....	52
3.1.1. Influência do pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M.....	52
3.1.2. Influência do tempo da reação de derivatização.....	54
3.2. Análise Cromatográfica.....	57
3.2.1. Influência do pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M.....	57
3.2.2. Influência da temperatura da coluna cromatográfica.....	59
4. CONCLUSÃO.....	61
5. REFERÊNCIAS.....	61
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE FUMONISINA B ₁ EM ARROZ POR CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA, EMPREGANDO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	67
RESUMO.....	67
ABSTRACT.....	68
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. MATERIAL e MÉTODOS.....	70
2.1. Material.....	70
2.1.1. Arroz	70
2.1.2. Padrão e Reagentes.....	71

2.1.3. Solução Padrão de Fumonisia B ₁	71
2.2. Métodos.....	71
2.2.1. Teor de Umidade.....	71
2.2.2. Reação de Derivatização.....	71
2.2.3. Análise Cromatográfica.....	72
2.2.4. Detecção e Quantificação de Fumonisia B ₁	72
2.2.5. Desenvolvimento de Método Analítico para Determinação de Fumonisia B ₁ em Arroz.....	72
2.2.5.1. Contaminação das Amostras.....	72
2.2.5.2. Extração e Purificação.....	73
2.2.5.3. Delineamento Experimental de Plackett & Burman (PB).....	73
2.2.5.4. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	74
2.2.5.5. Recuperação de Fumonisia B ₁	76
2.3. Descontaminação do Material.....	76
2.4. Análise Estatística.....	76
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	76
3.1. Delineamento Experimental de Plackett & Burman (PB).....	77
3.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	82
4. CONCLUSÃO.....	92
5. REFERÊNCIAS.....	92
CAPÍTULO IV – VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE FUMONISINA B ₁ EM ARROZ POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA.....	
RESUMO.....	97
ABSTRACT.....	98
1. INTRODUÇÃO.....	99
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	100

2.1. Material.....	100
2.1.1. Arroz.....	101
2.1.2. Padrão e Reagentes.....	101
2.1.3. Solução Padrão de Fumonisia B ₁	101
2.2. Métodos.....	101
2.2.1. Determinação de Fumonisia B ₁	101
2.2.1.1. Extração e Purificação.....	101
2.2.1.2. Derivatização.....	102
2.2.1.3. Análise Cromatográfica.....	102
2.2.1.4. Detecção e Quantificação de Fumonisia B ₁	103
2.2.2. Validação Intralaboratorial.....	103
2.2.2.1. Seletividade.....	103
2.2.2.2. Linearidade.....	103
2.2.2.3. Efeito de Matriz.....	104
2.2.2.4. Limites de Detecção e Quantificação.....	104
2.2.2.5. Exatidão.....	104
2.2.2.6. Precisão.....	105
2.2.2.7. Robustez.....	105
2.3. Descontaminação do Material.....	106
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
3.1. Seletividade.....	107
3.2. Linearidade.....	112
3.3. Efeito de Matriz.....	124
3.4. Limites de Detecção e Quantificação.....	126
3.5. Exatidão e Precisão.....	127

3.6. Robustez.....	130
4. CONCLUSÃO.....	131
5. REFERÊNCIAS.....	131
CAPÍTULO V – OCORRÊNCIA DE FUMONISINA B ₁ EM ARROZ COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE ARARAQUARA, SP.....	135
RESUMO.....	135
ABSTRACT.....	136
1. INTRODUÇÃO.....	137
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	139
2.1. Material.....	139
2.1.1. Arroz.....	139
2.1.2. Padrão e Reagentes.....	139
2.1.3. Solução Padrão de Fumonisia B ₁	140
2.2. Métodos.....	140
2.2.1. Preparo da Amostra.....	140
2.2.2. Teor de Umidade.....	140
2.2.3. Determinação de Fumonisia B ₁	140
2.2.3.1. Extração e Purificação.....	140
2.2.3.2. Derivatização.....	141
2.2.3.3. Análise Cromatográfica.....	141
2.2.3.4. Detecção e Quantificação de Fumonisia B ₁	142
2.3. Descontaminação do Material.....	142
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	142
4. CONCLUSÃO.....	148
5. REFEÊNCIAS.....	148
CONCLUSÕES.....	155

INTRODUÇÃO

O arroz é um cereal que faz parte do hábito alimentar brasileiro, o que se confirma pela aquisição domiciliar de arroz polido superior a 14 kg/habitante/ano. O Brasil se destaca na produção de arroz, estando entre os dez maiores produtores mundiais. A região Sul do Brasil é a responsável pela maior produção do cereal no país e o cultivo é feito principalmente sob a forma irrigada, condição que propicia a umidade necessária para a contaminação fúngica e, além disso, o cereal é rico em carboidratos, substrato favorável ao desenvolvimento destes micro-organismos.

Quando os grãos de cereais são colonizados por fungos tem-se o risco da contaminação por micotoxinas, que são metabólitos secundários formados em condições de estresse, desbalanço nutricional e em condições ambientais favoráveis, e que são capazes de causar alterações tóxicas, mutagênicas, teratogênicas ou carcinogênicas em animais e humanos. Os gêneros fúngicos mais frequentemente associados à produção de micotoxinas em cereais são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Ainda que o fungo seja inativado ou retirado durante o processamento e não venha estar presente no produto manufaturado, as toxinas podem permanecer viáveis, pois são dificilmente destruídas.

As fumonisinas são um grupo de micotoxinas produzidas principalmente pelas espécies fúngicas *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*. Foram isoladas pela primeira vez e sua estrutura química reportada, em 1988. Das fumonisinas detectadas, FB₁, FB₂ e FB₃ são as mais frequentemente encontradas nos alimentos, sendo que a fumonisina B₁ representa aproximadamente 70% da contaminação total das fumonisinas detectadas, e também considerada a mais tóxica.

As fumonisinas estão agrupadas no grupo 2B, como sendo possivelmente carcinogênicas aos seres humanos, segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC). Quanto à sua toxicidade, em animais, as fumonisinas causam leucoencefalomalácia, edema pulmonar, câncer hepático e hemorragia cerebral em equinos, suínos, ratos e coelhos, respectivamente. E no homem, as fumonisinas estariam associadas à incidência de câncer esofágico e defeitos no tubo neural.

O mecanismo de ação das fumonisinas não está claramente elucidado, mas sabe-se que a FB₁ intervém na biossíntese dos esfingolipídios, em função de sua similaridade estrutural com esfingosina e esfinganina, que são compostos intermediários na síntese dos esfingolipídeos.

Frente à toxicidade das fumonisinas, muitos são os estudos sobre a avaliação da ocorrência de fumonisina B₁ em diferentes alimentos, principalmente no milho e seus produtos. No Brasil, diversos trabalhos têm reportado a contaminação frequente e elevada por fumonisina B₁ dos grãos de milho e seus derivados, produzidos e comercializados em diferentes Estados do país.

O principal método analítico empregado na detecção e quantificação de fumonisina B₁ é o adotado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), o qual emprega derivatização pré-coluna com o reagente *orto*-ftaldialdeído e a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência.

Com relação à ocorrência de micotoxinas no arroz, estudos conduzidos no Brasil têm reportado a contaminação do cereal principalmente por aflatoxinas, deoxinivalenol, citreoviridina, ocratoxina e zearalenona. Quanto à micobiota, os gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os mais frequentemente isolados no arroz nacional.

O *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), em 2001, estabeleceu uma ingestão diária tolerável máxima provisória para fumonisinas B₁, B₂, B₃, sozinhas ou combinadas, de 2 µg por kg de peso corpóreo, a partir de estudos de toxicidade renal em roedores, considerando um NOEL (*No-Observed-Effect Level*) de 0,2 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo por dia e fator de segurança de 100.

Recentemente no Brasil foi aprovada a Resolução nº 7 de Fevereiro de 2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que dispõe sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos, onde se estabeleceu o limite máximo do somatório de fumonisinas B₁ e B₂ de 2000 µg.kg⁻¹ para milho de pipoca e de 200 µg.kg⁻¹ para alimentos a base de milho destinados à alimentação infantil.

O fato de o arroz ser um alimento quase que diário pela maioria da população brasileira torna-se importante o conhecimento da incidência e os níveis de contaminação do cereal por fumonisina B₁.

Para a avaliação de possíveis riscos à saúde pública brasileira, em função da exposição às micotoxinas a partir de um consumo quase que diário de arroz, e possível tomada de medidas efetivas, como o estabelecimento de limites máximos de micotoxinas no arroz, estudos sobre a ocorrência de fumonisina B₁ no arroz consumido e produzido no Brasil são fundamentais, no sentido de garantir a segurança alimentar da população.

OBJETIVOS

- ✓ Avaliar a influência dos parâmetros pH, tempo e temperatura sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-*orto*-ftaldialdeído;
- ✓ Estabelecer as condições cromatográficas para a separação, detecção e quantificação de fumonisina B₁ em arroz empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência;
- ✓ Desenvolver um método analítico para a determinação de fumonisina B₁ em arroz por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência, empregando planejamento fatorial associado à análise de superfície de resposta;
- ✓ Avaliar os parâmetros de desempenho do método analítico para a determinação de fumonisina B₁ em arroz – seletividade, linearidade, efeito de matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão e robustez, através de validação intralaboratorial;
- ✓ Avaliar a ocorrência de fumonisina B₁ em amostras de arroz dos subgrupos polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, comercializadas no município de Araraquara, SP.

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ARROZ

1.1. Características Gerais

O arroz (*Oryza sativa*, L.) originou-se no sudeste da Ásia, sendo provavelmente o principal alimento e a primeira planta cultivada neste continente. Os relatos mais antigos sobre o arroz encontram-se na literatura chinesa, há cerca de 5.000 anos, e foram os espanhóis os responsáveis pela disseminação do cereal nas Américas. Alguns historiadores apontam o Brasil como o primeiro país a cultivar o cereal no continente americano. Em 1587, lavouras arrozeiras já ocupavam terras na Bahia e em 1745 no Maranhão. No Rio de Janeiro, em 1766, foi instalada a primeira descascadora de arroz do Brasil. A prática da orizicultura de forma organizada e racional no país aconteceu em meados do século XVIII (BRASIL, 2006).

O Brasil é um dos poucos países não asiáticos no qual o arroz é cultivado e utilizado como gênero básico do consumo alimentar, estando entre os dez maiores produtores mundiais do cereal (FAO, 2011).

A produção de arroz no Brasil, estimada para a safra 2010/11, foi de 12 milhões e 628 mil toneladas, ou seja, um aumento de 8,3% em relação à safra 2009/10, segundo dados da Companhia Nacional Abastecimento (CONAB) (BRASIL, 2011a). A produção nacional de arroz concentra-se na região Sul, sendo esta a responsável por aproximadamente 75% da produção nacional, estimada para a safra 2010/11 (BRASIL, 2011a), sendo o cultivo principalmente sob a forma irrigada, empregando os sistemas – convencional, cultivo mínimo, plantio direto, pré-germinado, mix e transplante de mudas, os quais se diferenciam quanto à forma de preparo do solo, aos métodos de semeadura e ao manejo inicial da água (BRASIL, 2006).

O Estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz do Brasil, segundo dados estimados pela CONAB, na safra 2010/11 foram cultivados aproximadamente 1 milhão e 148 mil hectares, gerando 8 milhões e 213 mil toneladas de arroz, o que representou 65% da produção nacional (BRASIL, 2011a).

No Brasil, a Instrução Normativa nº. 6 de Fevereiro de 2009 classifica o arroz (*Oryza sativa* L.) em dois grupos segundo a sua forma de apresentação, arroz *em casca* e arroz *beneficiado* (BRASIL, 2009).

O arroz *em casca* é o produto com um percentual máximo admitido de 13% de umidade e 2% de matérias estranhas e impurezas, e ordenado nos subgrupos – *natural*, o

produto que, antes do beneficiamento, não passa por qualquer preparo industrial ou processo tecnológico, e *parboilizado*, o produto que foi submetido ao processo hidrotérmico de parboilização, no qual o arroz em casca é imerso em água potável, a uma temperatura acima de 58°C, seguido de gelatinização parcial ou total do amido e secagem (BRASIL, 2009).

O arroz *beneficiado* é o produto maduro o qual submetido ao processo de beneficiamento, encontra-se desprovido, no mínimo, de sua casca, com um percentual máximo admitido de 14% de umidade e apresentando os subgrupos – *polido*, o produto que ao ser beneficiado, retiram-se o germe, o pericarpo e a maior parte da camada interna, a aleurona; *parboilizado polido*, o produto que foi submetido ao processo de parboilização, que consiste na imersão do arroz ainda em casca em água potável, a uma temperatura acima de 58°C, seguido de gelatinização parcial ou total do amido, e secagem; *integral*, o produto do qual somente a casca foi retirada; e *parboilizado integral*, o produto cujos grãos apresentam-se desprovidos apenas de sua casca e que foram submetidos ao processo hidrotérmico de parboilização (BRASIL, 2009).

O arroz *em casca* e o arroz *beneficiado*, de acordo com as dimensões do grão são classificados nas seguintes classes: *longo fino* – é o produto que contém, no mínimo, 80% do peso dos grãos inteiros medindo 6,00 mm ou mais no comprimento, no máximo 1,90 mm de espessura e cuja relação comprimento/largura, seja maior ou igual a 2,75 mm, após o polimento dos grãos; *longo* – é o que contém, no mínimo, 80% do peso dos grãos inteiros medindo 6,00 mm ou mais no comprimento, após o polimento dos grãos; *médio* – é o que contém, no mínimo, 80% do peso dos grãos inteiros medindo de 5,00 mm a menos de 6,00 mm no comprimento, após o polimento dos grãos; *curto* – é o que contém, no mínimo, 80% do peso dos grãos inteiros medindo menos de 5,00 mm no comprimento, após o polimento dos grãos; *misturado* – é o produto que não se enquadra em nenhuma das classes anteriores (BRASIL, 2009).

O arroz *em casca* e o arroz *beneficiado*, de acordo com a qualidade dos grãos, são caracterizados em cinco tipos expressos por números arábicos de I a V, gradativamente proporcional ao percentual de ocorrência no produto de grãos picados ou manchados, danificados, mofados e ardidos, amarelos, vermelho e preto, gessados e verdes, e não-gelatinizados; de grãos quebrados e quirera; e de matérias estranhas e impurezas (BRASIL, 2009).

O consumo alimentar médio *per capita* de arroz no Brasil foi de 156,2 e 181,2 g do cereal por dia, e do arroz integral de 8,1 e 8,4 g por dia, nas áreas urbanas e rurais,

respectivamente, segundo dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF 2008-2009 (IBGE, 2011).

Entretanto, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação aponta que 15 a 16% da safra anual de arroz, em países em desenvolvimento, são perdidos em decorrência de práticas ineficientes de pós-colheita durante a secagem, armazenamento e processamento (FAO, 2004). As condições tropicais de temperatura, umidade elevada e o fato do arroz ser rico em carboidratos propiciam o desenvolvimento fúngico (COELHO et al., 1999), principalmente durante o armazenamento, podendo levar à rápida deterioração dos grãos, perda na qualidade nutricional e à contaminação por micotoxinas (ANDRADE et al., 2003; MAGAN e ALDRED, 2007).

1.2. Incidência de Micotoxinas no Arroz Nacional

No Brasil, embora a produção e o consumo de arroz sejam altos, os estudos sobre a avaliação da contaminação do cereal por micotoxinas ainda são poucos.

Soares e Rodriguez-Amaya (1989) ao avaliarem a ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina em alimentos brasileiros verificaram que das 60 amostras de arroz analisadas, duas amostras de arroz polido estavam contaminadas por aflatoxinas, uma apresentando $38 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de B_1 , $15 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de B_2 e $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de G_1 , e outra $26 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de B_1 .

Em estudo realizado na região Sul do Brasil, Furlong et al. (1999) ao analisarem um total de 47 amostras de arroz branco, integral, parboilizado e farelo de arroz comercializados em Pelotas e Rio Grande (RS) nos anos de 1996 e 1997, verificaram que duas amostras de farelo de arroz estavam contaminadas, uma com $48 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxina e outra com $35 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de ocratoxina A, e uma amostra de arroz parboilizado apresentou nível de $19 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de ocratoxina A.

Coelho, Furlong e Almeida (1999) ao estudarem a migração de micotoxinas no arroz durante o processo de parboilização, no Sul do Brasil, encontraram uma contaminação natural de ocratoxina A de $12 \mu\text{g.kg}^{-1}$ no arroz em casca.

Amostras de arroz integral, parboilizado e polido comercializados em Pelotas e Rio Grande (RS) no ano de 2000, também foram avaliadas quanto à ocorrência de micotoxinas. Três amostras, duas de arroz parboilizado e uma de arroz polido, apresentaram contaminação por zearalenona, em níveis de 559, 1955 e $1117 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente; duas amostras, uma de arroz parboilizado e outra de arroz polido, apresentaram níveis de ocratoxina A, de 128 e

104 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente; e uma amostra de arroz polido apresentou nível de 266 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ do tricoteceno deoxinivalenol (NUNES et al., 2003).

Na região Sul do Brasil, Dilkin et al. (2003) avaliando a ocorrência de ocratoxina A em amostras de arroz, no período de 1998 a 2003, encontraram três amostras contaminadas com uma concentração média de 41 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Dilkin et al. (2010) relataram que das 187 amostras de arroz analisadas, no período de janeiro de 2001 a abril de 2004, 26 amostras estavam contaminadas por aflatoxinas, com concentração média de 7,02 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e máxima de 101,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

No Estado de São Paulo, Simionato, Astray e Sylos (2003) ao analisarem amostras de arroz integral, parboilizado e polido comercializados no município de Araraquara (SP), relataram duas amostras (arroz polido, tipo 1, longo fino) contaminadas por aflatoxina B₁ (6 e 9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e traços de aflatoxina B₂.

No município de Curitiba (PR), Silva et al. (2008) ao analisarem 26 amostras de arroz beneficiado, polido, tipo 1, destinado ao consumo dos militares do Exército Brasileiro, no período de novembro de 2003 a fevereiro de 2004, encontraram seis amostras positivas para aflatoxina B₁ com níveis entre 0,54 e 2,04 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e uma contaminada por aflatoxina B₂ (1,84 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).

A ocorrência de micotoxinas no arroz nacional pode ser observada com o estudo conduzido por Santos et al. (2008), onde oito lotes de arroz em casca (tipos 1, 2 e 3, longo fino) totalizando 1.170,5 toneladas foram amostrados para avaliação da ocorrência de micotoxinas nas frações resultantes (arroz polido, casca, farelo e quirera) após o beneficiamento do cereal. Todas as frações pesquisadas apresentaram contaminação por algum tipo de micotoxina, sendo que das 8 frações analisadas de arroz polido, 7, 4, 2 e 1 frações estavam contaminadas por aflatoxina (< 0,06 a 11,05 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), ocratoxina A (< 0,1 a 0,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), zearalenona (< 3,6 a 67,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e citreoviridina (< 0,9 a 1,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), respectivamente.

No campo da saúde pública, nos anos de 2006 e 2007, foram notificados 466 e 543 casos de beribéri no Estado do Maranhão, respectivamente, e na investigação dos fatores determinantes as pesquisas revelaram a presença do fungo *Penicillium citreonigrum* no arroz consumido pela população tocantineira, e não se descartou uma possível contaminação por citreoviridina do arroz, uma vez que a micotoxina compete com a absorção de vitamina B₁ (tiamina) pelas células dos tecidos nervoso e muscular levando a quadros clínicos de beribéri (BRASIL, 2007; LIRA e ANDRADE, 2008).

No Sul do Brasil, Dors, Pinto e Badiale-Furlong (2009) relataram um nível de $17 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxina B₁ no arroz, ao estudarem a migração de micotoxinas durante o processo de parboilização do cereal. Mallmann et al. (2010) também relataram contaminação por aflatoxinas em 25% das 79 amostras de arroz analisadas.

Rosa et al. (2010), ao avaliarem amostras de arroz do Estado do Maranhão, reportaram em duas amostras de arroz do tipo cateto, em uma amostra do tipo agulhão e em duas amostras de farelo de arroz, níveis de 12 e $32 \mu\text{g.kg}^{-1}$, $96,7 \mu\text{g.kg}^{-1}$, e de 128 e $254 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente, da micotoxina citreoviridina.

Dors, Bierhals e Badiale-Furlong (2011) ao avaliarem a ocorrência de micotoxinas em arroz parboilizado, em um total de 32 lotes, relataram que 22, 19, 12,5 e 9% das amostras apresentaram contaminação por deoxinivalenol ($180 - 400 \mu\text{g.kg}^{-1}$), zearalenona ($317 - 396 \mu\text{g.kg}^{-1}$), ocratoxina A ($13 - 26 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e aflatoxina B₁ ($11 - 74 \mu\text{g.kg}^{-1}$), respectivamente.

Em relação à micobiota do cereal, Marassi et al. (2008) avaliando 365 amostras de diferentes variedades de arroz provenientes de municípios do Estado do Maranhão revelaram a contaminação de todas as amostras por fungos, sendo as mais freqüentes as espécies *Aspergillus flavus* e *Penicillium citrinum*, e em menor freqüência o gênero *Fusarium*.

Almeida et al. (2008) ao isolarem e identificarem espécies fúngicas em amostras de arroz de municípios do Estado do Maranhão, no ano de 2007, relataram que das 216 amostras analisadas, 178 estavam contaminadas com o gênero *Fusarium*, sendo a espécie *Fusarium verticillioides* a de maior ocorrência.

Em estudo sobre a micobiota do arroz em casca do Rio Grande do Sul, Hoeltz et al. (2009) verificaram na secagem estacionária e no armazenamento em silo-secador, a ocorrência principalmente das espécies *Aspergillus flavus* e *Penicillium commune*, e em menor freqüência o gênero *Fusarium*.

Com os estudos apresentados observa-se uma baixa freqüência da ocorrência de micotoxinas no arroz nacional, no entanto, não há estudos sobre a ocorrência de fumonisina B₁ em amostras de arroz, assim ressaltando a necessidade de estudos sobre a avaliação dos níveis de fumonisinas no arroz nacional.

2. FUMONISINAS

2.1. Características Físico-Químicas

Os fungos filamentosos produzem diversos metabólitos secundários, como pigmentos, antibióticos, fitotoxinas, além de compostos tóxicos denominados micotoxinas, que quando

nos alimentos e na ração animal estes metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais levando às micotoxicoses (MOSS, 1991).

As fumonisinas são exemplos destes metabólitos secundários tóxicos produzidos por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sinônimo de *Fusarium moniliforme* Sheldon) (BEZUIDENHOUT et al., 1988; GELDERBLOM et al., 1988). *Fusarium verticillioides* é a principal espécie produtora de fumonisinas, ocorre comumente no milho, trigo, arroz e aveia. Essa espécie tem larga distribuição na natureza e não ocorre somente em zonas tropicais e subtropicais, mas também em zonas temperadas úmidas e subúmidas (BACON e NELSON, 1994).

Outras espécies do gênero *Fusarium* também são produtoras de fumonisinas, como *Fusarium proliferatum* (ROSS et al., 1990), *Fusarium nygamai* (THIEL et al., 1992), *Fusarium anthophilum*, *Fusarium dlamini* e *Fusarium napiforme* (NELSON, 1992), *Fusarium subglutinans* (SCOTT, 1993), *Fusarium polyphialidicum* (ABBAS e OCAMB, 1995), *Fusarium oxysporum* (SEO e LEE, 1999).

As fumonisinas foram isoladas pela primeira vez de cultivos de *Fusarium moniliforme*, MCR 826, obtido de milho, e a estrutura química foi reportada pela primeira vez em 1988 (BEZUIDENHOUT et al., 1988; GELDERBLOM et al., 1988). Desde então, pelo menos 28 análogos já foram descritos (RHEEDER, MARASAS e VISMER, 2002). Três grupos de fumonisinas foram identificados com base na similaridade estrutural, sendo eles A, B e C. Os grupos A e B caracterizam-se pela presença de um grupo amida e amina, respectivamente. O grupo C é estruturalmente semelhante ao grupo B, porém não apresenta o grupo metil no C1 terminal (KRSKA, WELZIG e BOUDRA, 2007).

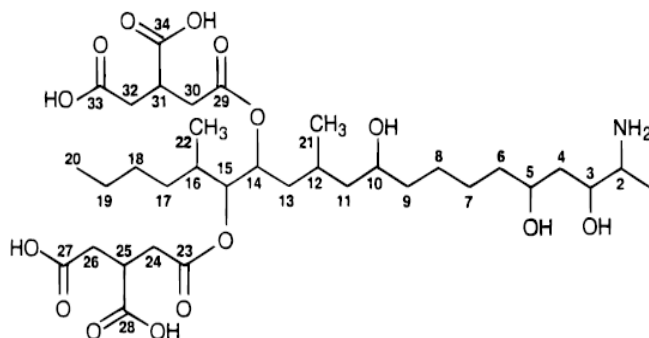
O primeiro relato sobre a ocorrência natural de FB₁ em alimentos foi realizado por Sydenham et al. (1990) em de milho mofado de uma área com alta incidência de câncer esofágico na população, Transkei na África do Sul, e os níveis detectados nas amostras variaram de 44 a 83 µg.g⁻¹.

Das fumonisinas identificadas até o momento, FB₁, FB₂ e FB₃ são as mais freqüentemente detectadas em alimentos naturalmente contaminados, sendo que a FB₁ é quase sempre a mais abundante, representando cerca de 70% da contaminação total de fumonisinas detectadas e também a mais tóxica (CAWOOD et al., 1991).

A fumonisina B₁ é um diéster de propano-1, 2, 3-ácido tricarboxílico e 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxi-eicosano em que nas posições C14 e C15 os grupos hidroxilas estão esterificados com um grupo carboxiterminal de propano-1,2, 3-ácido tricarboxílico (BEZUIDENHOUT et al., 1988) (Figura 1). As fumonisinas B₂ e B₃ diferem-se

pela ausência de uma hidroxila livre nas posições C10 e C5, respectivamente (KRSKA et al, 2007).

Figura 1 – Estrutura química da micotoxina fumonisina B₁.



Fonte: Dombink-Kurtzman e Dvorak, 1999.

A presença de grupos carboxílicos e hidroxilas na molécula das fumonisinas as caracterizam como moléculas fortemente polares, solúveis em água e solventes polares como o metanol, e acetonitrila. As fumonisinas não apresentam fluorescência e absorvem fracamente no ultravioleta, sendo necessária uma reação de derivação para sua determinação em CLAE com detecção de fluorescência (WILKES e SUTHERLAND, 1998).

Estudos demonstram que a fumonisina B₁ é estável ao calor e resistente à diferentes processamentos domésticos e industriais, como cozimento, fritura, branqueamento, moagem, fermentação, extrusão, e outros (SAUNDERS, MEREDITH e VOSS, 2001; BULLERMAN e BIANCHINI, 2007; VANARA, REYNERI e BLANDINO, 2009), o que justifica o interesse em avaliar os níveis em que estas micotoxinas se apresentam no arroz.

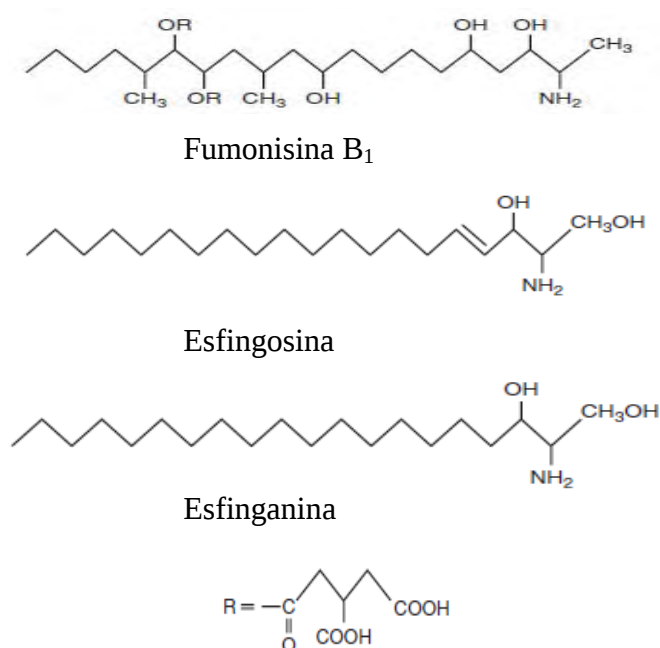
2.2. Mecanismo de Ação e Toxicidade

O mecanismo de ação das fumonisinas ainda não é claramente conhecido, mas Wang et al. (1991) propuseram que a FB₁ poderia intervir na biossíntese dos esfingolipídios, pois as fumonisinas apresentam similaridade estrutural com esfingosina e esfinganina, que são compostos intermediários na síntese dos esfingolipídeos (Figura 2).

A inibição da biossíntese dos esfingolipídeos pode ter um profundo efeito sobre a célula, uma vez que estes têm um papel importante na estrutura da membrana, comunicação e interação intracelular, regulação de fatores de crescimento, e são mensageiros de vários

fatores, incluindo fator de necrose tumoral, interleucina 1 e fator de crescimento de nervos. Portanto, uma inibição ou quebra na sequência do metabolismo desses esfingolípídeos poderia trazer graves consequências com transtornos orgânicos (MERRILL, 1991; MERRILL et al., 1993).

Figura 2 – Similaridade estrutural entre as moléculas de fumonisina B₁, esfingosina e esfinganina.



Fonte: Smith, 2007.

O sítio específico de ação da FB₁ provavelmente são as enzimas esfinganina e esfingosina N-acetiltransferase, também conhecidas como ceramida sintase, pois as fumonisinas tornam-se inibidores competitivos destas enzimas. A inibição desta via metabólica resulta na depleção do complexo esfingolípídeo e aumento intracelular de concentração de esfinganina livre, ou em menor grau de esfingosina livre (ABBAS, DUKE e TANAKA 1993).

Nos animais, as fumonisinas são as responsáveis por leucoencefalomalácia (LEME) em eqüinos (MARASAS et al., 1988); edema pulmonar, hidrotórax e hipertrofia medial das artérias pulmonares em suínos (HARRINSON et al., 1990; CASTEEL, TURK e ROTTINGHAUS, 1994); nefrotoxicidade e câncer hepático em ratos (GELDERBLUM et al., 1991); hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI, HASEN e LABORDE, 1996); aterosclerose

em macacos (NORRED, 1993); além da redução do desenvolvimento, problemas cardíacos, imunossupressão, degeneração e necrose hepática em aves (NORRED e VOSS, 1994).

Em humanos, a incidência de câncer esofágico em determinadas regiões da África do Sul (SYDENHAM et al., 1990; RHEEDER et al., 1992), China (CHU e LI, 1994), Itália (FRANCESCHI et al., 1990) e Irã (SHEPHARD et al., 2000) estaria provavelmente associada ao consumo de alimentos contendo altos níveis de fumonisinas, como também a promoção de câncer hepático na China (LI et al., 2001) e defeitos no tubo neural na fronteira México-Texas (MISSMER et al., 2006).

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou a fumonisina B₁ como pertencente a classe 2B, ou seja, possivelmente carcinogênica a seres humanos (IARC, 2011).

2.3. Incidência em Alimentos Nacionais

Nos últimos anos, vários trabalhos relataram a contaminação por fumonisinas de diferentes alimentos produzidos e comercializados no Brasil, principalmente os grãos de milho e seus derivados.

Kawashima e Valente Soares (2006), analisando 74 amostras de produtos a base milho comercializados em Recife (PE), no período de 1999 a 2001, detectaram fumonisina B₁ em 71 delas com concentrações variando de 20 a 8600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, sendo as concentrações mais altas em fubá, com uma média de 2700 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Em estudo realizado em Campinas (SP), a farinha de milho e o fubá apresentaram-se contaminados por fumonisina B₁, em média 740 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 2290 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente (MACHINSKI JR e VALENTE SOARES, 2000), assim como os comercializados em São Paulo (SP), em média 2100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 5200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de FB₁, respectivamente (BITTENCOURT et al., 2005).

Scaff e Scussel (2004) ao analisarem 82 produtos a base de milho comercializados no Estado de Santa Catarina em 2001, verificaram que 76 amostras apresentaram níveis detectáveis de fumonisinas, sendo a farinha de milho o produto com os maiores níveis de contaminação, com níveis médios 3811 e 5737 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de FB₁, para as de preparo artesanal e as industrializadas, respectivamente.

Produtos infantis derivados do milho comercializados no município de Campinas (SP) também foram avaliados quanto uma possível contaminação e revelaram a presença de fumonisinas B₁, B₂ e B₃ (CASTRO et al., 2004).

Caldas e Silva (2007) ao analisarem produtos de milho comercializados no Distrito Federal, relataram que 80,7% e 71,6% das 208 amostras apresentaram níveis de FB₁ e FB₂, respectivamente, sendo o creme de milho o produto com o maior teor médio de fumonisinas B₁ e B₂ (2.040 µg.kg⁻¹).

Levantamentos realizados em alguns Estados brasileiros revelaram uma contaminação do milho por fumonisina independente do Estado de origem. Hirooka et al. (1996) analisando amostras de milho do Paraná, Mato Grosso e Goiás, detectaram níveis entre 0,6 e 18,52 µg.g⁻¹ de FB₁, e de 1,2 a 19,13 µg.g⁻¹ de FB₂. No Estado de Santa Catarina amostras de milho para consumo humano mostraram-se contaminadas por fumonisinas do tipo B₁, B₂ e B₃ com níveis médios de 3.200, 3.400 e 1.700 µg.kg⁻¹, respectivamente (van der WESTHUIZEN et al., 2003).

Estudos com grãos de milho do Estado de São Paulo apontaram níveis consideráveis de fumonisinas nas amostras variando de 0,05 a 49,31 µg.g⁻¹ para FB₁ e 0,05 a 29,16 µg.g⁻¹ para FB₂ (CAMARGOS et al., 2000; ORSI et al., 2000; MACHINSKI JR, 2000; ALMEIDA et al., 2002). Amostras de milho de diferentes safras do Estado do Paraná também apresentaram-se contaminadas por fumonisinas com níveis entre 0,05 e 22,6 µg.g⁻¹ (ONO, 1999; ONO et al., 2001; ONO et al., 2004; MORENO et al., 2009). Em estudo realizado por Vargas et al. (2001), amostras de milho provenientes das regiões Sul, Central e Sudeste, 91% do total de amostras estavam contaminadas com fumonisina B₁.

Cervejas também foram pesquisadas, Kawashima, Vieira e Valente Soares (2007) analisando 58 amostras de cervejas clara e escura produzidas em diferentes Estados brasileiros e adquiridas entre os anos de 2000 e 2001, a fumonisina B₁ foi detectada em 25 amostras em concentrações variando de 1 a 40 ng.ml⁻¹.

Estes dados comprovam a contaminação por fumonisinas dos grãos de milho e seus produtos, cultivados e comercializados no país, reforçando assim a necessidade de estudos da provável ocorrência de fumonisina B₁ no arroz produzido e comercializado no país, já que não há dados na literatura.

2.4. Segurança Alimentar

A partir de estudos sobre a avaliação dos níveis de fumonisinas em milho e produtos a base de milho, tem-se avaliado a exposição dos brasileiros às fumonisinas através da dieta.

Machinski Jr e Valente Soares (2000), a partir dos níveis médios de fumonisina B₁ detectados em produtos a base de milho comercializados no município de Campinas (SP), no ano de 1999, e dos dados de consumo alimentar no Brasil publicados pelo IBGE, estimaram

uma ingestão diária de 1,28 μg de FB_1 por kg de peso corpóreo, nas áreas rurais, no entanto, para áreas urbanas a estimativa foi de 0,39 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ de peso corpóreo por dia, considerando um indivíduo adulto de 70 kg.

Em estudo sobre a ocorrência de fumonisinas B_1 e B_2 em fubá e farinha de milho comercializados no município de São Paulo (SP), no ano de 2000, Bittencourt et al. (2005) estimaram uma ingestão de 0,9 e 2,9 μg de FB_1 por kg de peso corpóreo por dia, considerando um indivíduo adulto de 70 kg, a partir do consumo de fubá em áreas metropolitanas e em áreas rurais, respectivamente.

Caldas e Silva (2007), em estudo conduzido no Distrito Federal, estimaram uma ingestão diária por indivíduo de 9,8 e 172 μg de fumonisinas B_1 e B_2 , considerando a população total e somente os consumidores do Distrito Federal, respectivamente, através do consumo de diferentes produtos a base de milho adquiridos no comércio local entre os anos de 2003 e 2005.

Na Quinquagésima Sexta Reunião do *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), em Geneva em 2001, em avaliação sobre a ocorrência de micotoxinas em alimentos, estimou-se uma ingestão diária de 1,0 μg de fumonisina B_1 por kg de peso corpóreo, através da dieta latino-americana. Na avaliação, consideraram-se dados submetidos pelos países, Argentina, Brasil, Uruguai, Canadá, Estados Unidos da América, Dinamarca, Suécia, Reino Unido e China, e o pressuposto de que todo milho consumido continha fumonisina B_1 em concentração média de 1.400 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ (JECFA, 2002).

Os dados das estimativas de ingestão diária são preocupantes, uma vez que Gelderblom et al. (1991) avaliando a hepatotoxicidade e carcinogenicidade das fumonisinas em ratos, proporam para humanos uma ingestão tolerável diária de 0,8 μg de FB_1 por kg de peso corpóreo.

O *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), em 2001, estabeleceu uma ingestão diária tolerável máxima provisória de 2 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ de peso corpóreo para fumonisinas B_1 , B_2 , B_3 , sozinhas ou combinadas, estabelecida a partir de estudos de toxicidade renal em roedores, considerando um NOEL (*No-Observed-Effect Level*) de 0,2 $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ de peso corpóreo por dia e fator de segurança de 100 (IPCS, 2002); o mesmo estabelecido, segundo a *European Mycotoxin Awareness Network* (EMAN), de 2 μg de fumonisina B_1 por kg de peso corpóreo por dia (SORIANO e DRAGACCI, 2004).

Frente à toxicidade das fumonisinas alguns países têm estabelecido os limites máximos permissíveis de fumonisinas B_1 , B_2 e B_3 só ou combinadas em alguns alimentos, principalmente em milho e seus derivados.

Em 2001, o *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceu os níveis máximos da combinação de fumonisinas B₁, B₂ e B₃, variando entre 2000 e 4000 µg.kg⁻¹, para milho e seus derivados destinados à alimentação humana (FDA, 2001).

Na União Européia estabeleceu-se um nível máximo do somatório de fumonisinas B₁ e B₂ de 200 µg.kg⁻¹ para produtos a base de milho destinados ao público infantil, e de 1000 µg.kg⁻¹, para milho e produtos a base de milho destinados ao consumo humano (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2007).

Recentemente no Brasil foi aprovada a Resolução nº 7 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que estabelece os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Os limites máximos permitidos para as fumonisinas B₁ e B₂ são de 200 e 2000 µg.kg⁻¹, para alimentos a base de milho destinados à alimentação infantil e para milho de pipoca, respectivamente (BRASIL, 2011b).

Estudos sobre a incidência e os níveis de fumonisinas principalmente em alimentos presentes diariamente na dieta da população, como o arroz no Brasil, tornam-se fundamentais, uma vez que estes estudos podem contribuir para a determinação dos limites máximos permitidos nos cereais e uma possível estimativa da exposição da população brasileira à micotoxina.

2.5. Metodologia Analítica

O principal método analítico empregado na detecção e quantificação de fumonisina B₁ em cereais é o descrito por Sydenham et al. (1996), e adotado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). O referido método, utilizado na determinação das fumonisinas B₁, B₂ e B₃ em milho, mostrou-se reprodutível, uma vez que as porcentagens de recuperação variaram entre 81,1 e 84,2 % para fumonisina B₁ em milho, em um estudo colaborativo envolvendo 12 laboratórios de 10 diferentes países (SYDENHAM et al., 1996).

Na extração das fumonisinas, a composição química da matriz a ser analisada, o tipo, o volume e o pH do solvente extrator, podem influenciar significativamente na capacidade de extração do método analítico (LINO, SILVA e PENA, 2006). A presença de grupos carboxílicos e hidroxilas na estrutura química das fumonisinas B₁, as caracterizam como moléculas polares, assim solventes como acetonitrila, metanol e água são preconizados a fim de garantir uma extração eficiente das fumonisinas.

No referido método AOAC-IUPAC, na etapa de extração, a amostra (50 g) e a solução extratora (100 mL de metanol: água, 3:1) são homogeneizadas em liquidificador por 5

minutos, seguido de centrifugação por 10 minutos, filtração em papel de filtro, e correção do pH do extrato entre 5,8 e 6,5, com NaOH 1 M (AOAC, 2005).

Na literatura, soluções extratoras compostas por metanol: água (7:3), acetonitrila: água (1:1), e metanol: acetonitrila: água (1:1:2), também têm-se sido reportadas para a extração de fumonisinas em milho e seus derivados. Entretanto, têm-se observado uma melhor extração das fumonisinas, com o emprego de soluções acetonitrila: água, em comparação às soluções de metanol: água (SHEPHARD, 1998; ARRANZ, 2004; LINO, SILVA e PENA, 2006).

A etapa de purificação consiste na remoção de impurezas da matriz e concentração das fumonisinas, na qual se emprega extração em fase sólida (SPE) em fase reversa, utilizando sílica octadecil (C18), troca aniônica (SAX), como também o emprego de colunas de imunoafinidade (IAC) e de resinas (Amberlite XAD). O tipo do procedimento de purificação pode influenciar nos limites de detecção e quantificação do método analítico, sendo necessária uma criteriosa seleção nesta etapa (SHEPHARD, 1998; LINO, SILVA e PENA, 2006).

Na etapa de purificação do método AOAC-IUPAC, empregam-se cartuchos de extração em fase sólida do tipo troca aniônica forte SAX (500 mg de trimetilaminopropil) e diferentes soluções de reagentes, como metanol, metanol: água (3:1) e ácido acético: metanol (1:99) para o acondicionamento do cartucho e a eluição das fumonisinas, na qual é necessário um criterioso controle da vazão de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (AOAC, 2005).

As fumonisinas B₁ não apresentam nenhum grupo cromóforo em sua molécula, portanto, não absorvem radiação ultravioleta e visível, e não apresentam fluorescência, assim torna-se imprescindível a reação de derivatização para sua determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência (KRSKA, WELZIG e BOUDRA, 2007).

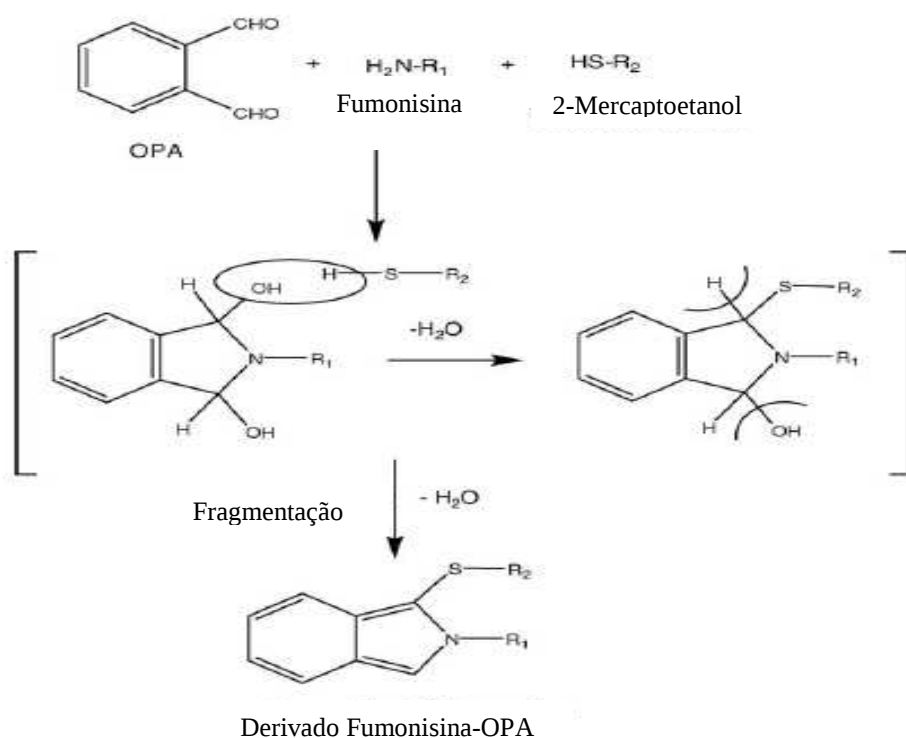
Na literatura diversos reagentes derivatizantes têm sido empregados, como 4-fluoro-7-nitrobenzofurazano (NBD-F) (SCOTT e LAWRENCE, 1992), 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC) (HOLCOMB, THOMPSON e HANKINS, 1993), naftaleno-2-3-dicarboxaldeído (NDA) (WARE et al., 1993), e 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinilmidil carbamato (AccQ.Fluor) (VELÁZQUEZ et al., 1995), que podem resultar na formação de derivados de fumonisina com maior estabilidade, podendo apresentar fluorescência por até 48 horas. No entanto, o reagente *orto*-ftaldialdeído (OPA) é o principal reagente utilizado na reação de derivatização pré-coluna da fumonisina B₁ e o adotado pela AOAC-IUPAC (SHEPHARD, 1998; ARRANZ et al., 2004; LINO, SILVA e PENA, 2006).

O reagente *orto*-ftaldialdeído (OPA) apresenta algumas vantagens como, baixo custo, em comparação aos outros derivatizantes; baixo limite de detecção ($50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), segundo

Shephard (1998), Arranz et al. (2004) e Sydenham et al. (1996); e por tratar-se de uma reação rápida, fácil e reprodutível à temperatura ambiente e em solução de tetraborato de sódio (Shephard, 1998). Entretanto, poucos minutos após a reação de derivatização, é necessária a injeção no cromatógrafo, pois o derivado fumonisina-*orto*-ftaldialdeído é instável, perdendo rapidamente a fluorescência (AOAC, 2005).

A Figura 3 apresenta a reação de derivatização empregando o reagente *orto*-ftaldialdeído. O grupo amina primária da fumonisina B₁ reage com o *orto*-ftaldialdeído, na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol, em meio alcalino, resultando na formação do derivado fumonisina B₁-*orto*-ftaldialdeído fluorescente.

Figura 3 – Reação entre o grupo amina primária da fumonisina B₁ e *orto*-ftaldialdeído (OPA) na presença de 2-mercaptoetanol.



Fonte: Samapundo et al., 2006.

Na separação, detecção e quantificação das fumonisinas nos alimentos são empregadas diferentes técnicas analíticas, como cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), métodos imunológicos e eletroforéticos. No entanto, a cromatografia líquida de

alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência é a mais reportada nos estudos sobre a ocorrência de fumonisina B₁ em milho e seus derivados, em função de sua alta sensibilidade e baixo limite de detecção (SHEPHARD, 1998; ARRANZ, 2004; LINO, SILVA e PENA, 2006).

Uma vez que fumonisina B₁ apresenta caráter polar, permiti-se sua separação por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, sendo acetonitrila, solução de ácido acético, água, metanol, tampão acetato e fosfato, os principais reagentes empregados como fase móvel, em diferentes combinações e proporções, em eluição isocrática ou gradiente. Na análise da fumonisina B₁ em milho e seus produtos, é amplamente utilizada solução tampão fosfato de sódio como fase móvel, cujo pH é ajustado com ácido fosfórico a 3,3 ou 3,35, e também adotada pela AOAC-IUPAC (AOAC, 2005; LINO, SILVA e PENA, 2006).

As fumonisinas apresentam comportamento iônico em solução, assim a separação em colunas de fase reversa envolve mecanismos tanto de fase reversa quanto de troca iônica, no entanto, em solventes neutros e não tamponados, estas não eluem convenientemente na maior parte das colunas de fase reversa, assim, as melhores resoluções cromatográficas são obtidas em fase móvel acidificada (LINO, SILVA e PENA, 2006). A solução tampão fosfato deve apresentar pH suficientemente ácido, na fase móvel, para garantir a supressão da ionização dos ácidos carboxílicos presentes na molécula de fumonisina B₁ (SHEPHARD et al., 1990).

As fases estacionárias normalmente empregadas são C₁₈ ou C₈, e as colunas variam entre 100 e 250 mm de comprimento, de 3,2 a 4,6 mm de diâmetro interno, e partículas de 2,5 a 10 µm de tamanho. De acordo com cada autor, observa-se variação no volume de injeção no sistema cromatográfico e no fluxo da fase móvel, de 10 a 50 µL, e de 0,5 a 1,5 mL.min⁻¹, sendo mais empregados 10 µL e 1 mL.min⁻¹, respectivamente (SHEPHARD, 1998; LINO, SILVA e PENA, 2006).

Quanto à detecção das fumonisinas, a por fluorescência, é amplamente utilizada na análise de fumonisinas em alimentos. Dado que, a derivatização com *orto*-ftalaldeído é a mais usada, os comprimentos de onda empregados na detecção são de 335 (excitação) e 440 nm (emissão) (SHEPHARD, 1998; AOAC, 2005; LINO, SILVA e PENA, 2006).

3. REFERÊNCIAS

ABBAS, H.K.; DUKE, S.O.; TANAKA, T. Phytotoxicity of fumonisin and related compounds. **Journal of Toxicology-Toxin Reviews**, v. 12, p. 225-251, 1993.

ABBAS, H.K.; OCAMB, C.M. First report of production of fumonisin B₁ by *Fusarium polyphialidicum* collected from seeds of *Pinus strobus*. **Plant Disease**, v. 79, p. 642-645, 1995.

ARRANZ, I.; BAEYENS, W.R.G.; VAN DER WEKEN, G. Review: HPLC determination of fumonisin mycotoxins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 195-203, 2004.

SEO, J.A.; LEE, Y.W. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1331-1334, 1999.

ALMEIDA, A.P; CORRÊA, B.; DIREITO, G.M.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; ORTEGA, E. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3877-3882, 2002.

ALMEIDA, T.X.; KELLER, K.M.; OLIVEIRA, A.A.; FARNOCHI, C.; CHULZE, S.; ROSA, C.A.R. Isolamento e identificação de espécies do gênero *fusarium* em amostras de arroz do estado do Maranhão. **Revista de Ciências da Vida**, v. 28, suplemento, p. 141-143, 2008.

ANDRADE, E.T.; COUTO, S.M.; QUEIROZ, D.M.; FARONI, L.R.D.; PEIXOTO, A.B. Qualidade de sementes de milho armazenadas em silo metálico cilíndrico. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 28, p. 23-30, 2003.

BACON, C.W.; NELSON, P.E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 6, p. 514-521, 1994.

BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of Chemical Society Chemical Communications**, v. 11, p.743-745, 1988.

BITTENCOURT, A. B. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in Sao Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 16, n. 2, p. 117-120, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Embrapa**: arroz e feijão. Goiás, 2006. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br>. Acesso em: 01 maio 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos, safra 2010/2011, quarto levantamento, janeiro/2011. Brasília: CONAB, 2011.a

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 6 de 16 de Fevereiro de 2009. Regulamento técnico do arroz. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 18 fev. 2009. Seção 1. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 3 fev. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7 de 18 de Fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 22 fev. 2011. Seção 1, p. 72. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html. Acesso em: 10 maio 2011.b

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surto de beri-beri em municípios do Maranhão**. Brasília, 2007. (Nota Técnica). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_beriberi2408.pdf. Acesso em: 02 maio 2009.

BUCCI, T.J.; HANSEN, D.K.; LABORDE, J.B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B₁. **Natural Toxins**, v. 4, p. 51–52, 1996.

BULLERMAN, L.B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 140–146, 2007.

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**, v. 55, p. 7974-7980, 2007.

CAMARGOS, S.M.; VALENTE SOARES, L.M.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Fumonisins in corn cultivars in the State of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 226-229, 2000.

CASTEEL, S.W.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Chronic effects of dietary fumonisin on the heart and pulmonary vasculature of swine. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 23, p. 518-524, 1994.

CASTRO, M.F.P.M.; SHEPHARD, G.S.; SEWRAM, V.; VICENTE, E.; MENDONÇA, T.A.; JORDAN, A. C. Fumonisins in Brazilian corn-based foods for infant consumption. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 7, p. 693-699, 2004.

CAWOOD, M.E.; GELDERBLOM, W.C.A.; VLEGGAAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Isolation of the fumonisin mycotoxins – a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 1958-1962, 1991.

CHU, F.S.; LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisina B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 847-852, 1994.

COELHO, C.S.P.; FURLONG, E.B.; ALMEIDA, T. L. Migração de micotoxinas durante a parboilização do arroz. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 1, 2, n. 2, p. 39-44, 1999.

DILKIN, M.; MÜRMANN, L.; KOWALSKI, C.H.; DILKIN, P.; ARAÚJO, D.D.F.; MALLMANN, C.A. Prevalência de ocratoxina A em arroz utilizado na alimentação humana. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 5., 2003. Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 2003. Disponível em: <http://www.lamic.ufsm.br/papers/12a.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2009.

DILKIN, M.; ARAÚJO, D.D.F.; FICK, F.A.; DILKIN, P.; MALLMANN, C.A. **Níveis de aflatoxinas em arroz**. Santa Maria: Laboratório de Análises Micotoxicológicas – LAMIC, 2010. Disponível em: <http://www.lamic.ufsm.br/papers/147z.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2010.

DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; DVORAK, T.J. Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 622-627, 1999.

DORS, G.C.; BIERHALS, V.S.; BADIALE-FURLONG, E. Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 172-177, 2011.

DORS, G.C.; PINTO, L.A.A.; BADIALE-FURLONG, E. Migration of mycotoxins into rice starchy endosperm during the parboiling process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 433–437, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **FAOSTAT: food and agricultural commodities production**, 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 4 fev. 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Rice and postharvest production**, 2004. Disponível em: <http://www.fao.org/rice2004/en/rice6.htm>. Acesso em: 02 maio 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Guidance for industry: fumonisin levels in human foods and animal feeds; final guidance**, 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ChemicalContaminantsandPesticides/ucm109231.htm>. Acesso em: 20 maio 2009.

FRANCESCHI, S.; BIDOLI, E.; BARON, A.E.; LA VECCHIA, C. Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1407–1411, 1990.

FURLONG, E.B.; SOARES, L.A.S.; VIEIRA, A.P.; DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 105-111, 1999.

GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAR, R.; KRIEK, N.P.J. Fumonisin: novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, 1806-1811, 1988.

GELDERBLOM, W.C.A.; KRIEK, N.P.; MARASAS, W.F.; THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1247–1251, 1991.

HARRISON, L.R.; COLVIN, B.M.; GREEN, J.T.; NEWMAN, L.E.; COLE, J.R. Pulmonary edema and hydropneumothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 217–221, 1990.

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

HOELTZ, M.; FAGUNDES, C.A.; ALCAYAGA, E.A.L.; NOLL, I.B. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 803-808, 2009.

HOLCOMB, M.; THOMPSON, H.C.; HANKINS, L.J. Analysis of Fumonisin B₁ in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOF and fluorescence detection. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 41, p. 764-767, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/pofanalise_2008_2009.pdf.pdf. Acesso em: 2 fev. 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. **Agents classified by the IARC monographs, volumes 1-102**. List of classifications by alphabetical order. França, 2011. Disponível em:

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Listagentsalphorder.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2012.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - IPCS. Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) – Monographs and Evaluations. **Fumonisin**. WHO, 2002. (WHO Food Additives Series 47). Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm>. Acesso em: 20 maio 2009.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES - JECFA. **Evaluation of certain mycotoxins in food**: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: WHO, 2002. p. 16-27. (WHO Technical Reports Series 906). Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_906.pdf. Acesso em: 09 dez. 2011.

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

KAWASHIMA, L.M.; VIEIRA, A.P.; VALENTE SOARES, L.M. Fumonisin B₁ and ochratoxin A in beers made in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 317-323, 2007.

KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 241-264, 2007.

LI, F.Q.; YOSHIZAWA, T.; KAWAMURA, O.; LUO, X.Y.; LI, Y.W. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 4122-4126, 2001.

LINO, C.M; SILVA, L.J.G.; 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.

LIRA, P.I.C.; ANDRADE, S.L.L.S. Epidemia de beribéri no Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, n.6, p. 1202-1203, 2008.

MACHINSKI JR, M.; VALENTE SOARES, L. M. Fumonisin B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 10, p. 875-879, 2000.

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

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 131-139, 2007.

MALLMANN, C.A.; KOWALSKI, C.H.; ALMEIDA, C.A.; DILKIN, P.; MÜRMANN, L.; DILKIN, M.; CARVALHO, R.R. **Contaminação por aflatoxinas nos alimentos de consumo humano – resultados do ano de 2002**. Santa Maria: Laboratório de Análises Micotoxicológicas – LAMIC, 2010. Disponível em: <http://www.lamic.ufsm.br/papers/135z.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2010.

MARASAS, W.F.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLOM, W.C.; COETZER, J.A.; THIEL, P.G.; VAN DER LUGT, J.J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 197-203, 1988.

MARASSI, A.C.; BARBOSA, T.S.; KELLER, L.A.M.; RODRIGUES, M.A.A.; KRÜGER, C.D.; ROSA, C.A.R. Micobiota isolada de amostras de arroz provenientes do estado do Maranhão destinadas ao consumo humano, em áreas de ocorrência de beribéri. **Revista de Ciências da Vida**, v. 28, suplemento, p. 150-152, 2008.

MERRIL, JR. A.H. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 23, p. 83-104, 1991.

MERRILL JR., A.H.; van ECHTEN, G.; WANG, E.; SANDHOFF, K. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 27299-27306, 1993.

MISSMER, S.A.; SUAREZ, L.; FELKNER, M.; WANG, E.; MERRILL JR., A.H.; ROTHMAN, K.J.; HENDRICKS, K.A. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 2, p. 237-241, 2006.

MORENO, E.C.; GARCIA, G.T.; ONO, M.A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y.S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, 2009.

MOSS, M.O. Economic importance of mycotoxins-recent incidence in the United States. **Animal Science**, v. 27, p. 3941-3949, 1991.

NELSON, P.E. Taxonomy and biology of *Fusarium verticillioides*. **Mycopathologia**, v. 117, p. 29-36, 1992.

NORRED, W.P. Fumonisin-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 38, p. 309-328, 1993.

NORRED W.P.; VOSS K.A. Toxicity and role of fumonisin in animal diseases and human esophageal cancer. **Food Protection**, v. 57, 522-527, 1994.

NUNES, I.T.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIN, T.E.; FURLONG, E.B. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.

ONO, E.Y.S.; FUNGARO, M.H.; SOFIA, S.H.; FIGUEIRA, E.L.; GERAGE, A.C.; ICHINOE, M. Trends of fumonisin contamination and animal intoxication through monitoring 1991 to 1997 corn crop in the State of Parana, Brazil. **Mycopathologia**, v. 158, n. 4, p. 451-5, 2004.

ONO, E.Y.S. **Microbiota fúngica, fumonisinas e efeitos da armazenagem em milho**. 1999. 137f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1999.

ONO, E.Y.S.; ONO, M.A.; FUNO, F.Y.; MEDINA, A.E.; OLIVEIRA, T.C. R. M.; KAWAMURA, O.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Evaluation of fumonisina-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 8, p. 719-729, 2001.

ORSI, R.B.; CORREA, B.; POZZI, C.R.; SCHAMMAS, A.E.; NOGUEIRA, J.R.; DIAS, S.M.C.; MALOZZI, M.A.B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 1, p. 75-87, 2000.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; VISMER, H.F. Production of fumonisins analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPARD, G.S.; van SCHALKWYK, D.J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, p. 353–357, 1992.

ROSA, C.A.R.; KELLER, K.M.; OLIVEIRA, A.A.; ALMEIDA, T.X.; KELLER, L.A.M.; MARASSI, A.C.; KRUGER, C.D.; DEVEZA, M.V.; MONTEIRO, B.S.; NUNES, L.M.T.; ASTORECA, A.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; EIFERT, E.C.; LIMA, T.A.S.; MODERNELL, K.G.; NUNES, F.I.B.; GARCIA, A.M.; LUZ, M.S.; OLIVEIRA, D.C.N. Production of citreoviridin by *Penicillium citreonigrum* strains associated with rice consumption and beriberi cases in the Maranhão State, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 2, p. 241-248, 2010.

ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; OSWEILLER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 3225-3226, 1990.

SAMAPUNDO, S.; DE MEULENAER, B.; DE MUER, N.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Influence of experimental parameters on the fluorescence response and recovery of the high-performance liquid chromatography analysis of fumonisin B₁. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, p. 312-316, 2006.

SANTOS, E.A.; GONÇALVES, G.A.A.; ALMEIDA, M.I.; SILVA, K.P.; GARCIA, J.C.; VARGAS, E.A. Ocorrência de micotoxinas em frações do beneficiamento de arroz. **Revista de Ciências da Vida**, v. 28, suplemento, p. 177-179, 2008.

SAUNDERS, D.S.; MEREDITH, F.I.; VOSS, K. A. Control of fumonisin: effect of processing. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, 2001.

SCAFF, R.M.C.; SCUSSEL, V.M. Fumonisin B₁ and B₂ in corn-based products commercialized in the State of Santa Catarina – Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 911-919, 2004.

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

SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. Liquid Chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 5, p. 829-834, 1992.

SHEPHARD, G.S.; MARASAS, W.F.; LEGGOTT, N.L.; YAZDANPANAH, H.; RAHIMIAN, H.; SAFAVI, N. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 1860-1864, 2000.

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

SIMIONATO, E.M.R.S.; ASTRAY, R.M.; SYLOS, C.M. Ocorrência de ocratoxina A e aflatoxinas em arroz. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 2, p. 123-130, 2003.

SMITH, G.W. Fumonisin. In: GUPTA, R.C. (Ed.). **Veterinary toxicology: basic and clinical principles**. New York: Academic Press, 2007. p. 983-997.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

SORIANO, J.M.; DRAGACCI, S. Intake, decontamination and legislation of fumonisin in foods. **Food Research International**, v. 37, p. 367-374, 2004.

SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P.W.; VAN SCHALKWYK, D.J. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 3, p. 688-696, 1996.

SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SHEPHARD, G.S.; VAN SCHALKWYK, D.J.; KOCH, K.R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 10, p. 1900-1903, 1990.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EC) n° 1126/2007 of 28 September 2007. Amending Regulation (EC) n° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. **Official Journal of the European Union**, 29 Sep. 2007. L 255/14.

THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLOM, W.C.A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, v. 117, p. 3-9, 1992.

VANARA, F.; REYNERI, A.; BLANDINO, M. Fate of fumonisin B₁ in the processing of whole maize kernels during dry-milling. **Food Control**, v. 20, p. 235-238, 2009.

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

VELÁZQUEZ, C.; van BLOEMENDAL, C. SANCHIS, V.; CANELA, R. Derivation of Fumonisin B₁ and B₂ with 6-Aminoquinolyl N-Hydroxysuccinimidylcarbamate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p. 1535-1537, 1995.

WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; RILEY, R.T.; MERRIL JR., A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium verticillioides*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 1486-1490, 1991.

WARE, G.M.; FRANCIS, O.; KUAN, S.S.; UMRIGAR, P.; CARMAN, A.; CARTER, L.; BENNETT, G.A. Determination of fumonisin B₁ in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Letters**, v. 26, n. 8, p. 1751-1770, 1993.

van der WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G. S.; SCUSSEL, V. M.; COSTA, L. L. F.; VISMER, H.F.; RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5574-5578, 2003.

WILKES, J.G.; SUTHERLAND, J.B. Sample preparation and high-resolution separation of mycotoxins possessing carboxyl groups. **Journal of Chromatography B**, v. 717, p. 135-156, 1998.

CAPÍTULO II – INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS pH, TEMPO E TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DO DERIVADO FUMONISINA B₁-ORTO-FTALDIALDEÍDO

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a influência dos parâmetros pH, tempo e temperatura sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído. Na avaliação da influência de cada parâmetro, variou-se o pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, usada como fase móvel de 2,3 a 4,8; o pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M, empregada na preparação do reagente de derivatização, de 4,0 a 12,0; o tempo da reação de derivatização entre 2 e 15 minutos; e a temperatura da coluna cromatográfica de 20 a 30°C. Na derivatização, com o emprego da solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0, observou-se a máxima fluorescência emitida pelo derivado, e esta não diferiu significativamente da emitida em pH 8,0, 8,5, 9,5 e 10,0. Variando o tempo da reação observou-se redução significativa na intensidade da fluorescência com o aumento do tempo da reação. Em 2 minutos de reação, observou-se a maior fluorescência e esta não diferiu significativamente da emitida em 4, 6 e 8 minutos de reação, entretanto, em 10 e 15 minutos houve uma redução significativa de 23 e 38% na intensidade da fluorescência, respectivamente. Nas análises cromatográficas, a variação de 0,5 unidade no pH da solução tampão, empregada como fase móvel, influenciou significativamente na separação e detecção do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído. Em pH 3,3, observou-se a máxima fluorescência emitida pelo derivado e esta não diferiu significativamente da emitida em pH 3,8. A temperatura da coluna cromatográfica influenciou significativamente na estabilidade do derivado, resultando em redução na intensidade da fluorescência com o aumento da temperatura. A 20°C, observou-se a máxima fluorescência emitida pelo derivado, porém esta não diferiu significativamente da emitida a 22, 25 e 27°C. A 30°C, observou-se uma redução significativa de 26,5% na intensidade da fluorescência, demonstrando uma possível instabilidade térmica do derivado em temperaturas a partir de 30°C.

Palavras-chave; Fumonisina B₁; Orto-ftaldialdeído; Estabilidade; CLAE.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the influence of the pH, time and temperature on the stability of the fumonisin B₁-*ortho*-phthaldialdehyde derivative. To evaluate the influence of each parameter, ranged the pH of the 0.1M sodium phosphate buffer solution, used as mobile phase, from 2.3 to 4.8; the pH of the 0.1M sodium tetraborate solution, used in the preparation of derivatization reagent, from 4.0 to 12.0; the derivatization reaction time from 2 to 15 minutes; and the temperature of the chromatographic column from 20 to 30°C. In the derivatization reaction, with the use of the sodium tetraborate solution pH 9.0, observed the maximum fluorescence emitted by derivative, but didn't differ significantly of that emitted in pH 8.0, 8.5, 9.5 and 10.0. Varying the derivatization reaction time observed significant reduction in the fluorescence intensity with increase of the reaction time. In 2 minutes of reaction observed the highest fluorescence, but didn't differ significantly of that emitted in 4, 6 and 8 minutes of reaction, however, in 10 and 15 minutes there was significant reduction of 23 and 38% in the fluorescence intensity, respectively. In the chromatographic analyses, the variation of 0.5 units in the pH of the buffer solution, used as mobile phase, influenced significantly in the chromatographic separation and detection of the fumonisin B₁-*ortho*-phthaldialdehyde derivative. At pH 3.3 observed the maximum fluorescence emitted by derivative, but didn't differ significantly of that emitted at pH 3.8. The chromatographic column temperature influenced significantly on the stability of the derivative, resulting in reduction in the fluorescence intensity with increase of the temperature. At 20°C, observed the maximum fluorescence emitted by derivative, but didn't differ significantly of that emitted at 22, 25 and 27°C. At 30°C, observed significant reduction of 26.5% in the fluorescence intensity, demonstrating a possible thermal instability of the derivative at temperatures from 30°C.

Keywords: Fumonisin B₁; *Ortho*-phthaldialdehyde; Stability; HPLC.

1. INTRODUÇÃO

As fumonisinas são metabólitos secundários produzidos principalmente por fungos filamentosos da espécie *Fusarium verticillioides*, foram isoladas pela primeira vez de cultivos de *Fusarium moniliforme* Sheldon MCR 826 obtidos de milho, e sua estrutura química foi reportada em 1988 por Bezuidenhout e colaboradores (BEZUIDENHOUT et al., 1988; GELDERBLOM et al., 1988).

O primeiro relato sobre a ocorrência natural de fumonisina B₁ em alimento foi em 1990 por Sydenham e colaboradores, em milho mofado de uma região da África do Sul com alta incidência de câncer esofágico, e os níveis detectados variaram de 44 a 83 µg.g⁻¹ (SYDENHAM et al., 1990). Desde então, em diferentes regiões do mundo, têm-se reportado a ocorrência de fumonisina B₁ em alimentos e bebidas, como arroz (PATEL et al., 1996; SCOTT, LAWRENCE e LOMBAERT, 1999; BRERA e MIRAGLIA, 2003; PARK et al., 2005; TANAKA et al., 2007), aspargo e alho (SEEFELDER et al., 2004), cevada (PARK et al., 2002), cervejas (TORRES, SANCHIS e RAMOS, 1998; KAWASHIMA, VIERIRA e VALENTE SOARES, 2007), figos secos (KARBANCIOGLU-GÜLER e HEPERKAN, 2009; HEPERKAN, KARBANCIOGLU-GÜLER e OKTAY, 2011), leite (MARAGOS e RICHARD, 1994; GAZZOTTI et al., 2009), e principalmente em milho e seus derivados (WEIDENBÖRNER, 2001; LINO, SILVA e PENA, 2004).

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou a fumonisina B₁ como pertencente ao grupo 2B, ou seja, possivelmente carcinogênica aos seres humanos (IARC, 2011). O mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que a fumonisina B₁ intervém na biossíntese dos esfingolipídios, em função de sua similaridade estrutural com a esfingosina e a esfinganina (WANG et al., 1991).

A incidência de câncer esofágico na África do Sul (SYDENHAM et al., 1990; RHEEDER et al., 1992), China (CHU e LI et al., 1994), Itália (FRANCESCHI et al., 1990) e Irã (SHEPHARD et al., 2000), e defeitos no tubo neural na fronteira México-Texas (MISSMER et al., 2006), estaria associada à ocorrência de fumonisina B₁ em altos níveis na dieta destas populações.

Assim, muitos estudos têm reportado o interesse em avaliar os níveis em que estas micotoxinas ocorrem nos alimentos. Para isto, diferentes técnicas analíticas, como cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), métodos imunológicos e eletroforéticos têm sido empregados na detecção e quantificação das fumonisinas nos alimentos, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por

fluorescência a técnica mais utilizada, em função de sua alta sensibilidade e baixo limite de detecção (LINO, SILVA e PENA, 2006).

A presença de grupos carboxílicos e hidroxilas na estrutura da fumonisina B₁ a caracteriza como molécula polar, solúvel em água e solventes como metanol e acetonitrila. No entanto, as fumonisinas B₁ não apresentam nenhum grupo cromóforo em sua molécula, portanto não absorvem radiação ultravioleta e visível, e não apresentam fluorescência, assim torna-se imprescindível a reação de derivatização para sua determinação por CLAE com detecção por fluorescência (KRSKA, WELZIG e BOUDRA, 2007).

Diferentes reagentes derivatizantes têm sido empregados na determinação de fumonisina B₁, como 4-fluoro-7-nitrobenzofurazano (NBD-F) (SCOTT e LAWRENCE, 1992), 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC) (HOLCOMB, THOMPSON e HANKINS, 1993), naftaleno-2-3-dicarboxialdeído (NDA) (WARE et al., 1993), e 6-amino-quinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ.Fluor) (VELÁZQUEZ et al., 1995), no entanto, o *orto*-ftaldialdeído (OPA) é o principal reagente utilizado na reação de derivatização pré-coluna da fumonisina B₁ (SHEPHARD, 1998; LINO, SILVA e PENA, 2006).

Uma vez que fumonisina B₁ apresenta caráter polar, permiti-se sua separação por cromatografia em fase reversa. Os principais solventes utilizados como fase móvel são acetonitrila, solução de ácido acético, água, metanol, tampão acetato e fosfato, em diferentes combinações e proporções, em eluição isocrática ou gradiente (LINO, SILVA e PENA, 2006).

As fases estacionárias geralmente são C₁₈ ou C₈, e as colunas variam entre 100 e 250 mm de comprimento, de 3,2 a 4,6 mm de diâmetro interno, e partículas de 2,5 a 10 µm de tamanho. De acordo com cada autor, observa-se variação também no volume de injeção no sistema cromatográfico e o fluxo da fase móvel, de 10 a 50 µL, e de 0,5 a 1,5 mL.min⁻¹, sendo mais empregados 10 µL e 1 mL.min⁻¹, respectivamente (SHEPHARD, 1998; LINO, SILVA e PENA, 2006).

Considerando a relevância dos estudos sobre a ocorrência de fumonisina B₁ em alimentos, é fundamental que as condições da reação de derivatização e das análises cromatográficas sejam controladas, a fim de obterem-se resultados analíticos precisos e exatos da contaminação do alimento por fumonisina B₁. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência dos parâmetros experimentais pH, tempo e temperatura sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-*orto*-ftaldialdeído durante as análises cromatográficas.

2. MATERIAL e MÉTODOS

2.1. Padrão e Reagentes

O padrão de fumonisina B₁ (98% de pureza) e o reagente de derivatização *orto*-ftaldialdeído (OPA) foram adquiridos da *Sigma-Aldrich, Inc.* (St. Louis, MO, USA). Acetonitrila, ácido acético glacial e metanol, todos grau CLAE, foram adquiridos da *J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc.* (Phillipsburg, NJ, USA). Ácido fosfórico e tetraborato de sódio foram adquiridos da *LabSynth* (Diadema, SP, Brasil), fosfato monossódico 1-hidrato da *Merck S.A.* (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 2-mercaptoetanol da *Vetec* (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), e ácido bórico da *Qhemis* (Indaiatuba, SP, Brasil). A água utilizada nas análises foi obtida através de sistema de ultra-purificação *Millipore MilliQ system* (Millipore, Milford, MA, USA).

2.2. Solução Padrão de Fumonisia B₁

O padrão de fumonisina B₁ (5 mg) foi dissolvido em 5 mL de solução de acetonitrila:água (1:1) obtendo uma solução estoque de 1000 µg.mL⁻¹, de acordo com a AOAC, 2005. A partir desta solução, preparou-se solução trabalho de 20 µg.mL⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar, envoltos em alumínio, e estocadas a -18°C.

2.3. Derivatização

A reação de derivatização da fumonisina B₁ foi de acordo com a AOAC (2005). O reagente de derivatização foi preparado empregando-se 40 mg de OPA, este dissolvido em 1 mL de metanol, diluídos com 5 mL de solução de tetraborato de sódio 0,1 M, e então adicionados 50 µL de 2-mercaptoetanol. O reagente foi estocado em frasco âmbar, envolto em papel de alumínio, protegido da luz e em temperatura ambiente, por no máximo até uma semana.

Alíquota de 225 µL do reagente de derivatização foi adicionada à um *vial* de 1,5 mL contendo 25 µL de solução padrão, e então mantidos em banho de ultrassom por 30 segundos em temperatura ambiente e protegidos da luz, previamente à injeção no cromatógrafo a líquido.

2.4. Análise Cromatográfica

Na separação, detecção e quantificação de fumonisina B₁ utilizou-se um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kioto, Japão), com sistema quaternário de

bombeamento de solvente, modelo LC 10AT VP, detector de fluorescência RF 10A XL em comprimentos de onda de 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão), injetor automático SIL 10A, e coluna cromatográfica ODS Hypersil (250 x 4,6 mm; partículas de 5 µm) (Thermo, Reino Unido). A fase móvel empregada foi acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M na proporção 44:56, respectivamente, em eluição isocrática, vazão de 1,0 mL.min⁻¹; e volume de injeção de 10 µL.

2.5. Influência do pH, Tempo e Temperatura sobre a Estabilidade do Derivado Fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído

2.5.1. Reação de Derivatização

2.5.1.1. pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M

Avaliou-se a influência do pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M empregada no preparo do reagente de derivatização. Prepararam-se diferentes soluções de tetraborato de sódio 0,1 M, cujo pH foi ajustado com ácido bórico 5 M entre 4,0 e 12,0. Dentro de 2 minutos, após a adição do reagente de derivatização à solução padrão de fumonisina B₁, realizou-se a injeção no cromatógrafo a líquido. Empregou-se solução padrão de 0,25 µg.mL⁻¹ de fumonisina B₁, temperatura da coluna cromatográfica de 20 °C, e fase móvel acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 (44: 56).

2.5.1.2. Tempo da reação de derivatização

O tempo da reação de derivatização, entre o instante que foi adicionado o reagente de derivatização à solução padrão de fumonisina B₁ até o momento da injeção no cromatógrafo, foi avaliado entre 2 e 15 minutos. Empregou-se solução padrão de 0,25 µg.mL⁻¹ de fumonisina B₁, e solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0 no preparo do reagente derivatizante. A temperatura da coluna cromatográfica manteve-se em 20 °C, e a fase móvel utilizada foi acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 (44:56).

2.5.2. Análise Cromatográfica

2.5.2.1. pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M

Na avaliação do pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M empregada como fase móvel prepararam-se diferentes soluções tampão fosfato de sódio 0,1 M, cujo pH foi ajustado

com ácido fosfórico entre 2,3 e 4,8. Empregou-se solução padrão de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de fumonisina B₁. No preparo do reagente derivatizante utilizou-se solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0, e dentro de 2 minutos, após a adição do reagente de derivatização à solução padrão de fumonisina B₁, realizou-se a injeção no cromatógrafo a líquido. A temperatura da coluna cromatográfica manteve-se em 20 °C.

2.5.2.2. Temperatura da coluna cromatográfica

A influência da temperatura da coluna sobre estabilidade do derivado foi avaliada, para isto foram empregadas solução padrão de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de fumonisina B₁, e solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0 no preparo do reagente derivatizante. Após a adição do reagente de derivatização à solução padrão de fumonisina B₁, dentro de 2 minutos, realizou-se a injeção no cromatógrafo a líquido. A fase móvel utilizada foi acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 (44:56), e variou-se a temperatura da coluna cromatográfica entre 20 e 30°C.

2.6. Análise Estatística

As determinações foram realizadas em triplicata. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%, empregando o software *Origin 7.0* (2000).

2.7. Descontaminação do Material

Todo material foi tratado com solução de hipoclorito de sódio 5% por pelo menos 12 h antes de ser descartado, seguido de acetona, e lavagem com água (BRASIL, 2005).

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1. Reação de Derivatização

3.1.1. Influência do pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M

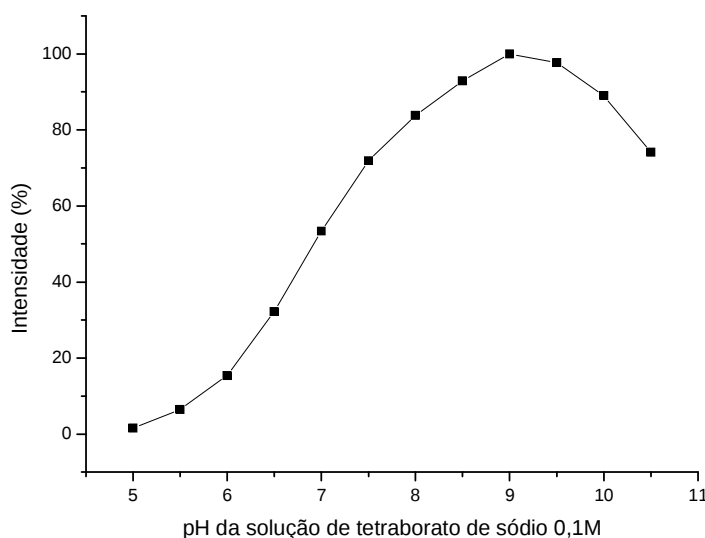
No presente estudo optou-se pelo emprego do derivatizante OPA, em função do custo do reagente, baixo limite de detecção, por tratar-se de uma reação rápida, fácil e reproduzível em temperatura ambiente, e ser aceito pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). A reação ocorre entre orto-

ftaldialdeído e o grupo amina primária da fumonisina B₁, na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol, em meio alcalino, resultando na formação de derivado fluorescente (SYDENHAM et al., 1996; SHEPHARD, 1998; ARRANZ et al., 2004; PAGLIUCA et al., 2005; LINO, SILVA e PENA, 2006).

Na preparação do reagente derivatizante OPA emprega-se 5 mL de solução de tetraborato de sódio 0,1 M, no entanto, na metodologia descrita na AOAC (2005), para a determinação de fumonisina B₁ em milho, não se aplica o ajuste do pH desta solução, mantendo-o entre 8,9 – 9,1, porém alguns trabalhos têm empregado a correção do pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M para 8,0 – 8,5 (RICE, ROSS e DEJON, 1995), 8,3 (TARDIEU et al., 2008), 9,5 (WARE et al., 1993) e 10,4 (CAMARGOS, MACHINSKI JR e VALENTE SOARES, 1999), diante destas divergências, objetivou-se verificar uma possível influência do pH da solução de tetraborato de sódio sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído.

A Figura 1 apresenta as diferentes condições de pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M e a fluorescência emitida pelo derivado. Nos extremos da faixa de pH avaliada, pH 4,0 e entre 11,0 e 12,0, não foi possível a detecção do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído, enquanto próximo a neutralidade, pH entre 5,0 e 7,0, observou-se fluorescência significativamente menor em relação à emitida em pH 9,0.

Figura 1 – Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em diferentes condições de pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M.



Nas reações de derivatização, as quais empregaram solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0 no preparo do reagente derivatizante, verificou-se a intensidade máxima de fluorescência e baixo coeficiente de variação, 3,0%, não diferindo significativamente da fluorescência emitida em pH 8,0 (83,8%), 8,5 (92,9%), 9,5 (97,7%) e 10,0 (89%), indicando que o derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído é estável na faixa de pH entre 8,0 e 10,0 da solução de tetraborato de sódio 0,1M empregada no preparo do reagente derivatizante.

Rice, Ross e Dejon (1995) variando o pH da solução de tetraborato de sódio 0,1 M de 6,0 a 9,0, reportaram maiores áreas do pico cromatográfico em valores de pH entre 8,0 e 8,5, e redução significativa nestas áreas em pH acima de 8,5.

A partir da Figura 1, pode-se observar o pH ótimo, 9,0, para a realização da reação de derivatização, a fim de manter a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído e a obtenção de resultados analíticos exatos e precisos.

3.1.2. Influência do tempo da reação de derivatização

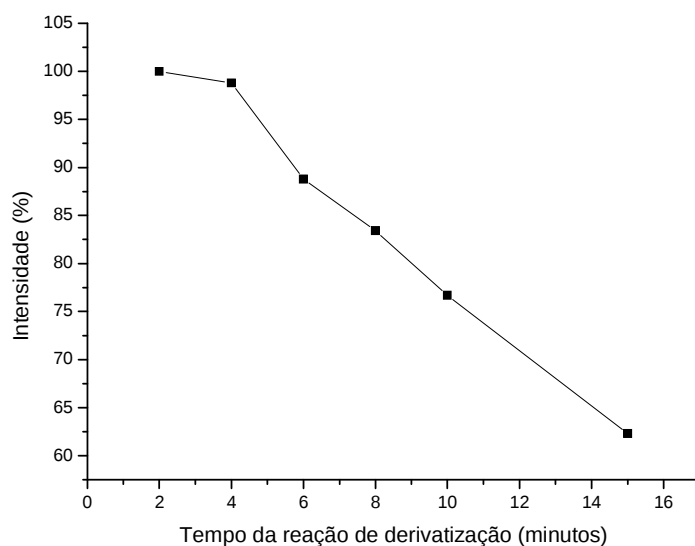
A reação de derivatização com OPA, em temperatura ambiente, resulta na formação de derivados fluorescentes, cuja intensidade da fluorescência pode decrescer minutos após a reação. Recomenda-se que o tempo de reação, entre o instante que é adicionado o reagente derivatizante à amostra até o momento da injeção no cromatógrafo, seja de 1 a 2 minutos (AOAC, 2005).

Com o propósito de avaliar a influência do tempo da reação de derivatização sobre a estabilidade do derivado variou-se o tempo de injeção no cromatógrafo a líquido em 2, 4, 6, 8, 10 e 15 minutos, após a adição do reagente derivatizante à solução padrão de fumonisina B₁.

Ao variar o tempo da reação, de 2 a 15 minutos, verificou-se uma redução significativa na intensidade de fluorescência do derivado (Figura 2). Com a reação de derivatização em 2 minutos, obteve-se a intensidade máxima de fluorescência, porém esta não diferiu significativamente da fluorescência emitida em 4 (98,8%), 6 (88,8%) e 8 (83,4%) minutos de reação, indicando que, em temperatura ambiente e sob proteção da luz, os derivados fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído são estáveis por até 8 minutos.

No entanto, em 10 e 15 minutos de reação, verificou-se redução de 23,3 e 37,7% na intensidade de fluorescência, respectivamente, comparadas à reação em 2 minutos. Notou-se que entre 6 (88,8%) e 10 (76,7%) minutos de reação não houve variação significativa na intensidade de fluorescência do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído.

Figura 2. Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em diferentes tempos da reação de derivatização.



A partir da Figura 2 verificou-se que a intensidade de fluorescência do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído é tempo-dependente, e que após 10 minutos de reação, houve um declínio significativo na fluorescência emitida.

Sydenham, Shephard e Thiel (1992) em estudo sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em diferentes tempos de reação, de 0,5 e 64 minutos e com exposição à luz, não observaram diferenças significativas na fluorescência dos derivados injetados até 4 minutos após a adição do derivatizante OPA. No entanto, após 8 e 64 minutos de reação houve redução de 5 e 48% da fluorescência, respectivamente, em comparação à reação em 0,5 minutos, recomendando-se que as injeções no cromatógrafo devam ser realizadas dentro de 4 minutos após a adição do reagente OPA.

Segundo Thakur e Smith (1996), a reação de derivatização em 1 minuto, na faixa avaliada entre 0,5 e 10 minutos, foi a que resultou em máxima intensidade de fluorescência, menor variação e resultados reprodutíveis, e que o declínio na fluorescência dos derivados com o aumento do tempo de reação não foi linear. Relataram também, que não houve diferença significativa na fluorescência dos derivados entre as derivatizações realizadas à 5 e 25°C.

Pagliuca et al. (2005) ao avaliarem a estabilidade dos derivados fumonisina B₁- *orto*-ftaldialdeído entre 0,5 e 10 minutos de reação, reportaram redução em aproximadamente 15, 20, 20 e 40% na intensidade da fluorescência em 2, 4, 6 e 10 minutos de reação, respectivamente, estabelecendo o tempo máximo de 1 minuto para a reação de derivatização.

Por outro lado, alguns estudos demonstraram estabilidade dos derivados fumonisina B₁-*orto*-ftaldialdeído em tempos maiores de reação de derivatização. Em estudo com amostras de milho, Rice, Ross e Dejon (1995) relataram que não houve diferença significativa na área dos picos cromatográficos quando a reação de derivatização foi conduzida entre 2 e 40 minutos, obtendo resposta máxima do detector em 10 minutos de reação, e um declínio linear nas áreas dos picos com o aumento dos tempos de reação, até atingir 70 minutos de reação.

Williams et al. (2004) reportaram que, em reação de derivatização à 4°C, o derivado fumonisina B₁-*orto*-ftaldialdeído permaneceu estável por até 24hs, demonstrando influência positiva da temperatura da reação de derivatização sobre a fluorescência dos derivados, assim sugerindo a refrigeração dos derivados por até 24hs, quando não há a possibilidade da realização das injeções cromatográficas naquele momento da análise.

Variando-se o tempo da reação de derivatização de 1 a 60 minutos e com o mínimo de exposição à luz, Samapundo et al. (2006) verificaram maior resposta do detector de fluorescência em 8 minutos de reação, a qual não diferiu significativamente das obtidas nos tempos de reação entre 4 e 15 minutos, entretanto, nos extremos, entre 1 e 2 minutos, e de 30 a 60 minutos, observaram-se repostas do detector significativamente menores.

Os resultados apresentados juntamente com os dados da literatura indicaram que o tempo da reação pode variar de acordo com as condições em que é realizada a derivatização, como temperatura e presença de luz, sendo imprescindível o estabelecimento do tempo ótimo para a reação, no qual se observa a intensidade máxima de fluorescência dos derivados, a fim de assegurar a reprodutibilidade do método.

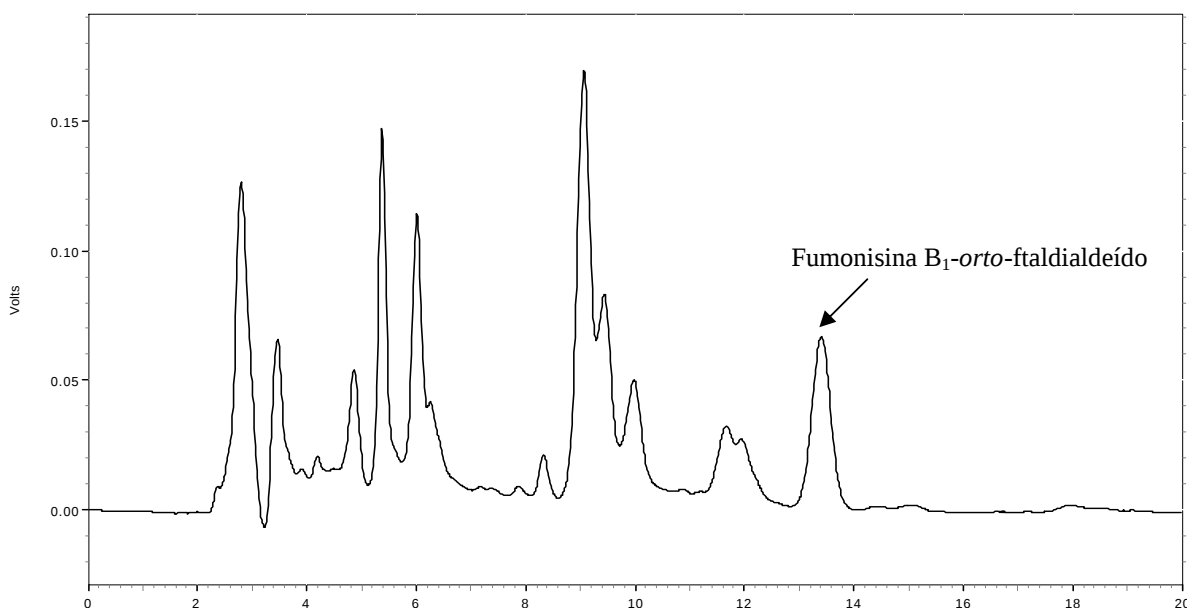
3.2. Análise Cromatográfica

3.2.1. Influência do pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M

Mantendo as condições pré-estabelecidas, vazão de 1mL.min.⁻¹, volume de injeção de 10 µL e fase móvel na proporção de 44:56, não foi possível a separação do pico cromatográfico de interesse com o emprego da solução tampão fosfato 0,1 M pH 2,3. No entanto, com aumento de 0,5 unidade no valor do pH, ou seja, 2,8, já foi possível a separação do pico cromatográfico dos possíveis interferentes da reação de derivatização no tempo de

retenção de 13,5 minutos, além da obtenção de picos cromatográficos bem definidos, ou seja, mais estreitos, sem cauda frontal e ombro (Figura 3), porém a intensidade de fluorescência do derivado (61,4%) foi significativamente menor que a emitida em pH 3,3.

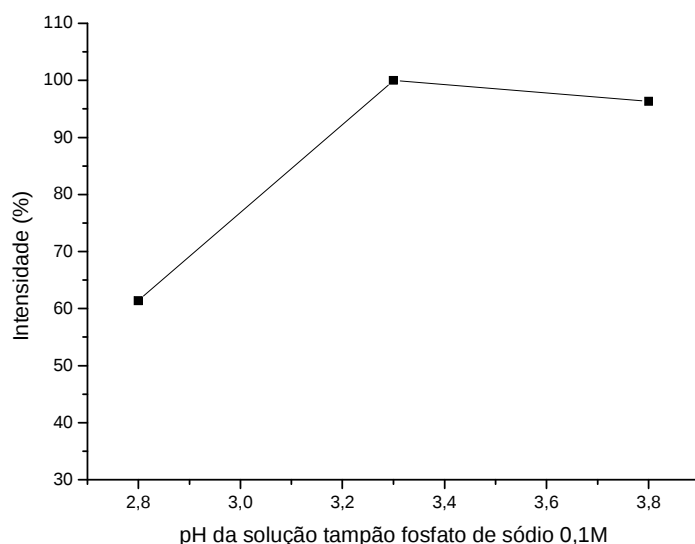
Figura 3 – Cromatograma característico da separação e detecção do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído.



Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 (44:56), vazão: 1,0 mL.min.⁻¹, temperatura da coluna: 20°C, volume injetado: 10 µL e coluna ODS Hypersil de 25 mm x 4,6 mm e partículas de 5 µm.

Na análise da fumonisina B₁ é amplamente utilizada solução tampão fosfato de sódio como fase móvel, cujo pH é ajustado com ácido fosfórico a 3,3 ou 3,35 (AOAC, 2005; LINO, SILVA e PENA, 2006). No presente estudo, a solução tampão fosfato de sódio com pH ajustado a 3,3 foi a que apresentou intensidade máxima de fluorescência emitida pelo derivado e menor coeficiente variação, 1,2%, no entanto uma variação do pH de 3,3 a 3,8 resultou em redução de 3,7% na intensidade de fluorescência emitida pelo derivado, porém não significativa. A Figura 4 ilustra a influência do pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M sobre a estabilidade do derivado, onde se pode observar o pH ótimo de 3,3 para a realização das análises cromatográficas.

Figura 4. Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em diferentes condições de pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M.



Com o emprego na fase móvel de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M com valores de pH mais elevados (4,3 e 4,8), nas condições pré-estabelecidas, não foi possível a detecção do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído.

Segundo Shephard et al. (1990), na fase móvel, a solução tampão fosfato deve apresentar pH suficientemente ácido para garantir a supressão da ionização dos ácidos carboxílicos presentes na molécula de fumonisina B₁. As fumonisinas apresentam comportamento iônico em solução, assim a separação em colunas de fase reversa envolve mecanismos tanto de fase reversa quanto de troca iônica, porém em solventes neutros e não tamponados, estas não eluem convenientemente na maior parte das colunas de fase reversa, assim, as melhores resoluções cromatográficas são obtidas em fase móvel acidificada (LINO, SILVA e PENA, 2006).

Samapundo et al. (2006), em estudo sobre a influência de diferentes parâmetros experimentais na análise do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído, verificaram que o pH da fase móvel (metanol: solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, 3:1) influenciou significativamente na resposta do detector de fluorescência. Em pH 2,85, observou-se a menor resposta do detector, enquanto no pH 3,85 a resposta do detector foi significativamente maior que no pH 3,35.

Variando o pH da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M em 0,5 unidade, observou-se que o derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído é estável na faixa entre 3,3 e 3,8, sendo fundamental o controle do pH da solução tampão empregada como fase móvel, a fim de obter-se picos cromatográficos bem definidos e o mínimo de variação na fluorescência do derivado.

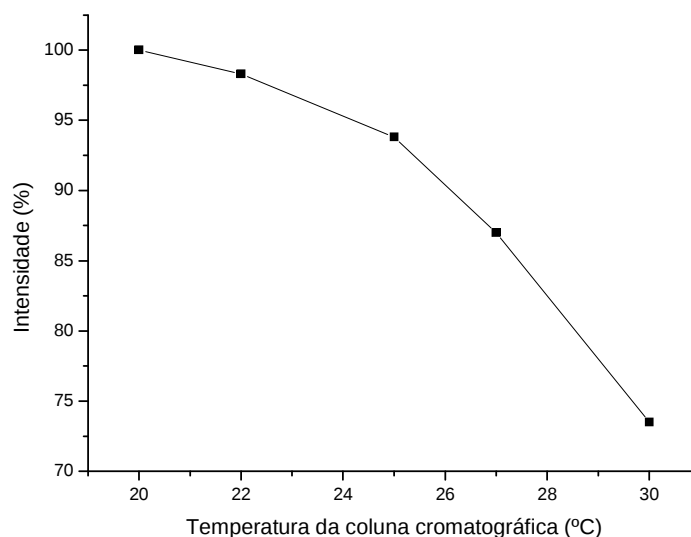
3.2.2. Influência da temperatura da coluna cromatográfica

Em levantamento bibliográfico sobre as metodologias analíticas empregadas na determinação de fumonisina B₁ por CLAE com detecção de fluorescência, notou-se na maioria a não especificação da temperatura da coluna cromatográfica em que são realizadas as análises. Por outro lado, quando especificada, observou-se diferentes temperaturas, como 20°C (SAMAPUNDO et al., 2006), 23°C (AOAC, 2005), 24°C (ALMEIDA et al., 2002) e 30°C (BITTENCOURT et al., 2005; BATATINHA et al., 2007), assim objetivou-se verificar possível influência da temperatura da coluna cromatográfica sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído.

A Figura 5 apresenta as temperaturas da coluna cromatográfica avaliadas e a fluorescência emitida pelo derivado. Ao variar a temperatura da coluna de 20 a 30°C verificou-se redução na intensidade de fluorescência com o aumento da temperatura. Em análise cromatográfica a 20°C observou-se a intensidade máxima de fluorescência e baixo coeficiente de variação, 3,9%, porém não diferiu significativamente da fluorescência emitida a 22°C (98,3%), 25°C (93,8%) e 27°C (87%), demonstrando estabilidade térmica do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído na faixa entre 20 e 27°C.

No entanto, em temperatura de 30°C verificou-se redução significativa de 26,5% na intensidade de fluorescência do derivado, em relação a 20°C, demonstrando possível instabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em temperaturas acima de 27°C, indicando que as análises cromatográficas devam ser realizadas entre 20 e 27°C.

Figura 5 – Fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído em diferentes temperaturas da coluna cromatográfica.



Samapundo et al. (2006), avaliando três diferentes temperaturas na análise cromatográfica do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído, verificaram diferenças significativas na resposta do detector entre as temperaturas de 22°C, 30°C e 35°C, sugerindo possível instabilidade térmica do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído com o aumento da temperatura.

Williams, Meredith e Riley (2004), ao estudarem o efeito da temperatura sobre a análise cromatográfica de fumonisina B₁, verificaram que os derivados fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído são mais estáveis a 4°C do que a 24°C, e que a instabilidade destes pode ser atribuída à ausência do grupo hidroxila na posição C1 de sua molécula, grupo que está presente na molécula da esfinganina, cujos derivados esfinganina-orto-ftaldialdeído demonstraram ser estáveis por até 24 h à temperatura de 24°C.

A partir da Figura 5 foi possível visualizar a influência da temperatura da coluna cromatográfica durante as análises cromatográficas sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído. Assim, com o propósito de evitar possíveis variações na resposta do detector, e obter resultados confiáveis e reprodutíveis, torna-se necessário o controle da temperatura da coluna cromatográfica.

4. CONCLUSÃO

Os parâmetros pH, tempo e temperatura influenciaram significativamente sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído. Verificou-se intensidade máxima de fluorescência emitida pelo derivado com o emprego, na derivatização, de solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0 e reação em 2 minutos; e nas análises cromatográficas, de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 e temperatura da coluna cromatográfica de 20°C. Assim, torna-se imprescindível o controle do pH da solução tampão empregada como fase móvel e da solução de tetraborato de sódio utilizada no preparo do reagente derivatizante, como também do tempo da reação de derivatização e da temperatura da coluna cromatográfica, a fim de obter-se fluorescência máxima e o mínimo de variação, e assim assegurar a precisão e a exatidão das análises cromatográficas.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.P; CORRÊA, B.; DIREITO, G.M.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; ORTEGA, E. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3877-3882, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18th ed. Gaithersburg: AOAC, 2005.

ARRANZ, I.; BAEYENS, W.R.G.; VAN DER WEKEN, G.; DE SAEGER, S.; VAN PETEGHEM, C. Review: HPLC Determination of Fumonisin Mycotoxin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 195-203, 2004.

BATATINHA, M.J.M.; SIMAS, M.M.S.; BOTURA, M.B.; BITENCOURT, T.C.; REIS, T.A.; CORREA, B. Fumonisin in brewers grain (barley) used as dairy cattle feed in the State of Bahia, Brazil. **Food Control**, v. 18, p. 608-612, 2007.

BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST - ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of Chemical Society, Chemical Communications**, v. 11, p.743-745, 1988.

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, n. 2, p. 117-120, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. p. 758.

BRERA, C.; MIRAGLIA, M. (Co-ord.). Task 3.2.10 “Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins if food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States”. Subtask III: fumonisins. In: GARIES, M. **SCOOP TASK 3.2.10: “Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins if food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States”: final report**. s. l.: Commission European, 2003. p. 483-577. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2011.

CAMARGOS, S.M.; MACHINSKI JR, M.; VALENTE SOARES, L.M. Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B₁, e B₂ em milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 71-79, 1999.

CHU, F.S.; LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisina B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People’s Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 847-852, 1994.

FRANCESCHI, S.; BIDOLI, E.; BARON, A.E.; LA VECCHIA, C. Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1407-1411, 1990.

GAZZOTTI, T.; LUGOBONI, B.; ZIRONI, E.; BARBAROSSA, A.; SERRAINO, A.; PAGLIUCA, G. Determination of fumonisin B₁ in bovine milk by LC-MS/MS. **Food Control**, v. 20, p. 1171-1174, 2009.

GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N.P.J. Fumonisins: novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, 1806-1811, 1988.

HEPERKAN, D.; KARBANCIOGLU-GÜLER, F.; OKTAY, H.I. Mycoflora and natural occurrence of aflatoxin, cyclopiazonic acid, fumonisin and ochratoxin A in dried figs. **Food Additives and Contaminants: Part A**, p. 1-10, 2011.

HOLCOMB, M.; THOMPSON, H.C.; HANKINS, L.J. Analysis of Fumonisin B₁ in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOC and fluorescence detection. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 41, p. 764-767, 1993.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. **Agents classified by the IARC monographs, volumes 1-102**. List of classifications by alphabetical order. França, 2011. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Listagentsalphorder.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2012.

KARBANCIOGLU-GÜLER, F.; HEPERKAN, D. Natural occurrence of fumonisina B₁ in dried figs as an unexpected hazard. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 289-292, 2009.

KAWASHIMA, L.M.; VIEIRA, A.P.; VALENTE SOARES, L.M. Fumonisin B₁ and ochratoxin A in beers made in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 317-323, 2007.

KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 241-264, 2007.

LINO, C.M; SILVA, L.J.G.; PENA, A.S. Fumonisinas: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n. 552, p. 181-192, 2004.

LINO, C.M; SILVA, L.J.G.; 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.

MARAGOS, C.M.; RICHARD, J.L. Quantitation and stability of fumonisin B₁ and B₂ in milk. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 5, p. 1162-1167, 1994.

MISSMER, S.A.; SUAREZ, L.; FELKNER, M.; WANG, E.; MERRILL JR. A.H.; ROTHMAN, K.J.; HENDRICKS, K.A. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 2, p. 237-241, 2006.

PAGLIUCA, G.; ZIRONI, E.; CECCOLINI, A.; MATERA, R.; SERRAZANETTI, G.P.; PIVA, A. Simple method for the simultaneous isolation and determination of fumonisin B₁ and its metabolite aminopentol-1 in swine liver by liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 819, p. 97-103, 2005.

PARK, J.W.; CHOI, S.Y.; HWANG, H.J.; KIM, Y.B. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 305-314, 2005.

PARK, J.W.; KIM, E.K.; SHON, D.H.; KIM, Y.B. Natural co-occurrence of aflatoxin B₁, fumonisin B₁ and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 11, p. 1073-1080, 2002.

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

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPARD, G.S.; VAN SCHALKWYK, D.J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, p. 353-357, 1992.

RICE, L.G.; ROSS, P.F.; DEJON, J. Evaluation of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins in corn, poultry feed, and *Fusarium* culture material. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 4, p. 1002-1009, 1995.

SAMAPUNDO, S.; DE MEULENAER, B.; DE MUER, N.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Influence of experimental parameters on the fluorescence response and

recovery of the high-performance liquid chromatography analysis of fumonisin B₁. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, p. 312-316, 2006.

SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. Liquid Chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 5, p. 829-834, 1992.

SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A., LOMBAERT, G.A. Studies on extraction of fumonisins from rice, corn-based foods and beans. **Mycotoxin Research**, v. 15, p. 50-60, 1999.

SEEFELDER, W.; KNECHT, A.; GOBMANN, M.; KLETA, S.; BÜTTNER, C.; HUMPF, H.U. Occurrence of fumonisins in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) from Germany. **Mycotoxin Research**, v. 20, p. 29-30, 2004.

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

SHEPHARD, G.S.; MARASAS, W.F.; LEGGOTT, N.L.; YAZDANPANAH, H.; RAHIMIAN, H.; SAFAVI, N. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 1860-1864, 2000.

SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, n. 10, p. 2077-2087, 1990.

SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in foods and feeds. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 2, p. 313-318, 1992.

SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SHEPHARD, G.S.; VAN SCHALKWYK, D.J.; KOCH, K.R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 10, p. 1900-1903, 1990.

TANAKA, K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; KUSHIRO, M. Mycotoxins in rice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 59-66, 2007.

TARDIEU, D.; AUBY, A.; BLUTEAU, C.; BAILLY, J.D.; GUERRE, P. Determination of fumonisin B₁ in animal tissues with immunoaffinity purification. **Journal of Chromatography B**, v. 870, p. 140-144, 2008.

THAKUR, R.A.; SMITH, J.S. Determination of fumonisins B₁ and B₂ and their major hydrolysis products in corn, feed, and meat, using HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1047-1052, 1996.

TORRES, M.R.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 139-143, 1998.

VELÁZQUEZ, C.; van BLOEMENDAL, C. SANCHIS, V.; CANELA, R. Derivation of Fumonisin B₁ and B₂ with 6-Aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidylcarbamate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p. 1535-1537, 1995.

WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; RILEY, R.T.; MERRIL, JR. A.M. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium verticillioides*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 1486-1490, 1991.

WARE, G.M.; FRANCIS, O.; KUAN, S.S.; UMRIGAR, P.; CARMAN, A.; CARTER, L.; BENNETT, G.A. Determination of fumonisin B₁ in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Letters**, v. 26, n. 8, p. 1751-1770, 1993.

WEIDENBÖRNER, M. Foods and fumonisins. **European Food Research and Technology**, v. 212, p. 262-273, 2001.

WILLIAMS, L.D.; MEREDITH, F.I.; RILEY, R.T. Fumonisin-*ortho*-phthalaldehyde derivative is stabilized at low temperature. **Journal of Chromatography B**, v. 806, p. 311-314, 2004.

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE FUMONISINA B₁ EM ARROZ POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA, EMPREGANDO PLANEJAMENTO FATORIAL

RESUMO

O objetivo do estudo foi desenvolver um método analítico para a determinação de fumonisina B₁ em arroz por cromatografia líquida de alta eficiência. No desenvolvimento do método, empregou-se como referência o procedimento *QuEChERS*, usado na determinação de multiresíduos de pesticidas em vegetais, e planejamento fatorial – delineamentos de Plackett & Burman (PB) e Composto Central Rotacional (DCCR). A partir do delineamento de Plackett & Burman verificou-se que as variáveis da etapa de extração – concentração de acetonitrila, volume de ácido acético glacial e a quantidade de sulfato de sódio anidro, influenciaram significativamente ($p \leq 0,05$) na porcentagem de recuperação da micotoxina. A partir das porcentagens de recuperação obtidas com o delineamento Composto Central Rotacional, os coeficientes de regressão foram determinados, e apenas os termos lineares das variáveis foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,1$), assim, os parâmetros com coeficientes de regressão não significativos foram excluídos, e então obtido o modelo codificado de 1ª ordem reparametrizado, que descreve a porcentagem de recuperação de fumonisina B₁ em função das variáveis – concentração de acetonitrila (%), volume de ácido acético glacial (mL) e quantidade sulfato de sódio anidro (g). A partir da análise de variância, concluiu-se que o modelo codificado é adequado, pois apresentou regressão significativa ($p \leq 0,05$) e porcentagem de variação explicada (R^2) de 85,8%, o que representa uma boa concordância entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados experimentalmente. A partir da metodologia de planejamento fatorial associado à análise de superfície de resposta foi possível definir as condições de cada variável estudada, e assim obter um novo método analítico para determinação de fumonisina B₁ em arroz. Um método de fácil execução, economicamente viável, rápido, com menor geração de resíduos orgânicos e porcentagem de recuperação satisfatória para a micotoxina avaliada.

Palavras-chave: Arroz; Fumonisina B₁; CLAE, Planejamento fatorial.

ABSTRACT

The aim of study was to develop a analytical method for determination of the fumonisin B₁ in rice samples, using high performance liquid chromatography. In the development, was employed as reference the *QuEChERS* procedure used in the determination of multiresidue pesticides in vegetables, and Plackett & Burman and Rotational Central Composite designs. From Plackett & Burman design was verified that extraction step variables – acetonitrile concentration, glacial acetic acid volume, and anhydrous sodium sulphate amount, influenced significantly ($p \leq 0.05$) on the mycotoxin recovery percentage. From of the recovery percentages obtained with the rotational central composite design, was determined the regression coefficients, and only the linear terms of the parameters were statistically significant ($p \leq 0.1$), so the parameters with no significant regression coefficients were excluded, and then obtained the first order coded model, which describes the fumonisin B₁ recovery percentage in function of the variables - acetonitrile concentration (%), glacial acetic acid volume (mL) and sodium sulphate amount (g), reparametrized to a significance level of 10%. From variance analysis, concluded that the coded model was appropriate, because the regression was significant ($p \leq 0.5$) and the explained variance percentage (R^2) was of 85.8%, which represents a good agreement between the values predicted by model and values obtained experimentally. From the factorial design associated to response surface analysis was possible to define the conditions for each variable, and thus obtain a new method for determination of the fumonisin B₁ in rice samples. An easy, cheap, and fast method, with less organic residuals and mycotoxin recovery percentage satisfactory.

Keywords: Rice; Fumonisin B₁; HPLC; Factorial design.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes técnicas analíticas para a separação, detecção e quantificação das fumonisinas em alimentos são reportadas, como cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), métodos imunológicos e eletroforéticos. No entanto, a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência é a mais utilizada, em vista da sua alta sensibilidade e baixo limite de detecção (SHEPHARD, 1998; ARRANZ et al., 2004; LINO, SILVA e PENA, 2006).

Na literatura, o principal método analítico reportado para a determinação de fumonisina B₁, em amostras de milho e derivados, é o descrito por Sydenham et al. (1996) e adotado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), o qual emprega derivatização pré-coluna e a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência (AOAC, 2005).

O referido método da AOAC-IUPAC, parte de uma extração de considerável quantidade de amostra (50 g) e de solução extratora (100 mL de metanol:água, 3:1), seguido de homogeneização em liquidificador, centrifugação, filtração, e correção de pH do extrato entre 5,8 e 6,5, com NaOH 1M (AOAC, 2005).

Na purificação do extrato, são requeridos cartuchos de extração em fase sólida do tipo troca aniônica forte SAX (500 mg de trimetilaminopropil) e diferentes soluções de reagentes, como metanol, metanol: água (3:1) e ácido acético: metanol (1:99) para o acondicionamento do cartucho e a eluição das fumonisinas. Durante a eluição das micotoxinas é necessário um criterioso controle da vazão de 1mL.min⁻¹ (AOAC, 2005). Todo este procedimento torna o método laborioso, requer maior tempo nas análises e consideráveis volumes de solventes, além da necessidade de cartuchos de extração em fase sólida importados, consequentemente resulta em um maior custo, maior tempo para a execução das análises e geração de resíduos orgânicos.

Estudos sobre a avaliação da ocorrência de fumonisina B₁ em arroz têm empregado na etapa de purificação do extrato cartuchos de extração em fase sólida do tipo troca aniônica forte (SAX) (PATEL et al., 1997; SCOTT et al., 1999; PARK et al., 2005) e colunas de imunoafinidade (SEO et al., 2009), o que encarecem as análises.

Na derivatização pré-coluna emprega-se o reagente *orto*-ftaldialdeído (OPA), o qual apresenta algumas vantagens como, baixo custo, em comparação aos outros derivatizantes, baixo limite de detecção, e por ser uma reação rápida, fácil e reprodutível em temperatura ambiente (SHEPHARD, 1998; ARRANZ et al., 2004; LINO, SILVA e PENA, 2006). Entretanto, minutos após a reação de derivatização, é necessária a injeção no cromatógrafo,

pois o derivado fumonisina B₁-orto-ftaldialdeído é instável, perdendo rapidamente a fluorescência (AOAC, 2005).

Apesar do método da AOAC-IUPAC apresentar boa reprodutibilidade, o que se confirma pelo estudo colaborativo entre 12 laboratórios de 10 diferentes países, com porcentagens de recuperação entre 81,1 e 84,2 % para fumonisina B₁ em milho (SYDENHAM et al., 1996), um novo método analítico menos laborioso, com menor custo, e menor número de etapas e geração de resíduos orgânicos é atualmente desejado.

Assim, o procedimento *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), descrito por Anastassiades et al. (2003), empregado na determinação de multiresíduos de pesticidas em vegetais, apresenta as características analíticas ideais para a extração e purificação de fumonisina B₁ em arroz. O procedimento emprega uma pequena quantidade de amostra (10 g) e de solvente extrator (10 mL de acetonitrila), seguido de rápida agitação e centrifugação, e na etapa de purificação do extrato emprega-se uma pequena quantidade de adsorvente, o que o torna um método rápido, fácil e barato.

Nos últimos anos, alguns estudos já estão empregando o procedimento *QuEChERS*, com modificações, na determinação, por exemplo, das micotoxinas zearalenona e tricotecenos (CUNHA e FERNANDES, 2010; SOSPEDRA et al., 2010; WU et al., 2011), como também no desenvolvimento de métodos multi-micotoxinas empregando espectrometria de massa (SULYOK et al., 2006; MOL et al., 2008; SPANJER et al., 2008; FRENICH et al., 2009; DESMARCHELIER et al., 2010; RASMUSSEN et al., 2010; VACLAVIK et al., 2010). Outros, têm reportado o emprego do *QuEChERS* na determinação de fumonisina por CLAE com espectrometria de massa (TREBSTEIN et al., 2009; DALL'ASTA et al., 2010; ZACHARIASOVA et al., 2010).

Assim, o objetivo do estudo foi desenvolver um método analítico, de fácil execução, economicamente viável, rápido e com menor geração de resíduos orgânicos, para a determinação de fumonisina B₁ em amostras de arroz, com referência no procedimento *QuEChERS* e empregando planejamento fatorial associado à análise de superfície de resposta.

2. MATERIAL e MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Arroz

Amostras de arroz, cujo rótulo declarava arroz branco, tipo 1, classe longo fino, grupo beneficiado e subgrupo polido, foram adquiridas no município de Araraquara, SP, no ano de 2010. O cereal foi triturado em multi processador (Arno[®], SP, Brasil) até obtenção de amostra homogênea, passado por peneira de 20 *mesh* e acondicionado em potes plásticos, em temperatura ambiente, até o momento das análises, as quais foram realizadas no mesmo dia da trituração do cereal.

2.1.2. Padrão e Reagentes

O padrão de fumonisina B₁ (98% de pureza) e o reagente de derivatização *orto*-ftaldialdeído (OPA) foram adquiridos da *Sigma-Aldrich, Inc.* (St. Louis, MO, USA). Acetonitrila, ácido acético glacial e metanol, todos grau CLAE, foram adquiridos da *J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc.* (Phillipsburg, NJ, USA). Ácido fosfórico e tetraborato de sódio foram adquiridos da *LabSynth* (Diadema, SP, Brasil), fosfato monossódico 1-hidrato e cloreto de sódio da *Merck S.A.* (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 2-mercaptoetanol da *Vetec* (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Sulfato de sódio anidro da *Qhemis* (Indaiatuba, SP, Brasil) e Celite[®] (Hyflo SuperCel) da *Almeria S.A.* (Guadalajara, México). A água utilizada nas análises cromatográficas foi obtida através de sistema de ultra-purificação *Millipore MilliQ system* (Millipore, Milford, MA, USA).

2.1.3. Solução Padrão de Fumonisina B₁

O padrão de fumonisina B₁ (5 mg) foi dissolvido em 5 mL de solução de acetonitrila:água (1:1) obtendo uma solução estoque de 1000 µg.mL⁻¹, de acordo com a AOAC (2005). A partir desta solução, preparou-se solução trabalho de 20 µg.mL⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar, envoltos em alumínio, e estocadas a -18°C.

2.2. Métodos

2.2.1. Teor de Umidade

O teor de umidade das amostras de arroz foi determinado por gravimetria empregando balança de infravermelho modelo ID 200 (Marte[®], SP, Brasil). Empregou-se massa de 3,00 g do cereal triturado, peneirado e homogeneizado, e a porcentagem de umidade da amostra informada automaticamente pelo equipamento.

2.2.2. Reação de Derivatização

A reação de derivatização da fumonisina B₁ foi de acordo com a AOAC (2005). O reagente de derivatização foi preparado empregando-se 40 mg de OPA, este dissolvido em 1 mL de metanol, diluídos com 5 mL de solução de tetraborato de sódio 0,1 M (pH 8,9 – 9,1), e então adicionados 50 µL de 2-mercaptoetanol. O reagente foi estocado em frasco âmbar, envolto em papel de alumínio, protegido da luz e em temperatura ambiente, por no máximo até uma semana.

Alíquota de 225 µL do reagente de derivatização foi adicionada à um *vial* de 1,5 mL contendo 25 µL de extrato da amostra purificado, e então mantidos em banho de ultra-som por 30 segundos em temperatura ambiente e protegidos da luz. Dentro de 4 minutos, após a adição do reagente de derivatização, realizou-se a injeção no cromatógrafo a líquido.

2.2.3. Análise Cromatográfica

Na separação, detecção e quantificação da fumonisina B₁ utilizou-se um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kioto, Japão), com sistema quaternário de bombeamento de solvente, modelo LC 10AT VP, detector de fluorescência RF 10A XL em comprimentos de onda de 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão), injetor automático SIL 10A, e coluna cromatográfica ODS Hypersil (250 x 4,6 mm; partículas de 5 µm) (Thermo, Reino Unido). A temperatura da coluna durante as análises manteve-se em 20°C, e o tempo total de corrida foi de 20 minutos. A fase móvel empregada foi acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico, na proporção 44:56, respectivamente, em eluição isocrática, vazão de 1,0 mL.min⁻¹, e volume de injeção de 10 µL.

2.2.4. Detecção e Quantificação de Fumonisina B₁

A detecção de fumonisina B₁ foi realizada através da comparação entre os tempos de retenção da amostra e do padrão (AOAC, 2005), de 13,5 ± 0,5 minutos, e a quantificação através do método de padronização externa, utilizando-se as áreas dos picos cromatográficos. Empregou-se uma curva de calibração do padrão de fumonisina B₁ em solvente (acetonitrila: água, 1:1), na faixa de 500 a 2500 µg.kg⁻¹.

2.2.5. Desenvolvimento de Método Analítico para Determinação de Fumonisina B₁ em Arroz.

2.2.5.1. Contaminação das Amostras

As amostras de arroz foram contaminadas artificialmente com solução padrão de fumonisina B₁ (20 µg.mL⁻¹), 12 horas antes do início das análises, a fim de se obter concentração final de 2000 µg.kg⁻¹ em cada amostra, esta considerada o limite máximo permitido em milho não processado, pela legislação brasileira (BRASIL, 2011).

2.2.5.2. Extração e Purificação

O procedimento *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*) empregado na determinação de multiresíduos de pesticidas em vegetais, descrito por Anastassiades et al. (2003), foi utilizado como referência no desenvolvimento do método analítico para a determinação de fumonisina B₁ em amostras de arroz.

Na etapa de extração, em um tubo de centrifugação de polipropileno de 50 mL Nalgene[®] (Thermo Scientific, Rochester, NY, USA), foram adicionados 10 g de amostra de arroz, 20 mL de solução de acetonitrila, e ácido acético glacial, seguido de agitação em vórtex, e posterior adição de sulfato de sódio anidro e cloreto de sódio, novamente agitação em vórtex e centrifugação à 7500 rpm.

Na purificação, 5 mL do extrato obtido na etapa de extração, sulfato de sódio anidro e Celite[®] foram adicionados à um tubo de centrifugação de polipropileno de 50 mL, e este agitado em vórtex e centrifugado à 7500 rpm. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm Millex[®] (Millipore, Barueri, SP, Brasil), e então realizada a reação de derivatização.

2.2.5.3. Delineamento Experimental de Plackett & Burman (PB)

Com o objetivo de avaliar o efeito de cada variável, das etapas de extração e purificação, sobre a recuperação de fumonisina B₁ (%) do método, empregou-se um delineamento de seleção de variáveis do tipo Plackett & Burman de 16 ensaios. Foram avaliadas onze variáveis em dois níveis cada e realizados três ensaios no ponto central, de acordo com Rodrigues e Iemma (2009).

A Tabela 1 apresenta os níveis para cada variável independente estudada, baseados nas condições estabelecidas por Lehotay (2007). A massa da amostra (10 g) e o volume de solvente extrator (20 mL) foram mantidos constantes, uma vez que na literatura ambos contribuíram para porcentagens de recuperação satisfatórias. A Tabela 2 apresenta as condições dos ensaios de Plackett & Burman.

Tabela 1 – Variáveis avaliadas no delineamento de Plackett & Burman e seus respectivos níveis codificados.

	Variáveis	Código	Níveis		
			-1	0	+1
Extração	Concentração de acetonitrila (%)	X ₁	50	55	60
	Ácido acético (mL)	X ₂	0,1	0,125	0,15
	Agitação (minutos)	X ₃	1	1,5	2
	Sulfato de sódio anidro (g)	X ₄	1,0	2,5	4,0
	Cloreto de sódio (g)	X ₅	0,5	0,75	1,0
	Agitação (minutos)	X ₆	1	2	3
	Centrifugação (minutos)	X ₇	2	3	4
Purificação	Sulfato de sódio anidro (g)	X ₈	0,3	0,5	0,7
	Celite [®] (g)	X ₉	0,1	0,15	0,2
	Agitação (segundos)	X ₁₀	30	45	60
	Centrifugação (minutos)	X ₁₁	2	3	4

Tabela 2 – Matriz do delineamento de Plackett & Burman de 16 ensaios – PB 16.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁
1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1
8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
12	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1
13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1
15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

2.2.5.4. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A partir dos resultados obtidos com o delineamento de Plackett & Burman elaborou-se um novo delineamento – Composto Central Rotacional, segundo Rodrigues e Iemma

(2009), com o objetivo de definir as condições das etapas de extração e purificação do método.

Foram analisadas as variáveis - concentração de acetonitrila (%), volume de ácido acético (mL) e quantidade de sulfato de sódio anidro (g), da etapa de extração, em cinco níveis cada (Tabela 3). E manteve-se fixo os parâmetros - agitação (1 min.), cloreto de sódio (0,5g) e centrifugação (2 min.), na etapa de extração; e sulfato de sódio anidro (0,3g), Celite® (0,1 mg), agitação (30 seg.) e centrifugação (2 min.), na etapa de purificação.

No delineamento incluíram-se seis pontos axiais ($\pm \alpha = (2^K)^{1/4}$; onde k = número de variáveis independentes) e três repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios (Tabela 4).

Tabela 3 – Variáveis avaliadas no Delineamento Composto Central Rotacional e seus respectivos níveis codificados.

Variáveis		Código	Níveis				
			-1,68	-1	0	+1	+1,68
Extração	Concentração de acetonitrila (%)	X ₁	40	44	50	56	60
	Ácido acético (mL)	X ₂	0,07	0,1	0,15	0,2	0,23
	Sulfato de sódio (g)	X ₄	1,0	1,6	2,5	3,4	4,0

Tabela 4 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional.

Ensaios	X ₁	X ₂	X ₄
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

2.2.5.5. Recuperação de Fumonisina B₁

Na avaliação das etapas de extração e purificação empregou-se a porcentagem de recuperação do método, que foi calculada como a razão percentual entre a concentração de fumonisina B₁ determinada e a concentração adicionada, utilizando-se a curva de calibração na faixa de 500 a 2500 µg.kg⁻¹.

2.3. Descontaminação do Material

Todo material foi tratado com solução de hipoclorito de sódio 5% por pelos menos 12 horas antes de ser descartado, seguido de acetona, e lavagem com água (BRASIL, 2005).

2.4. Análise Estatística

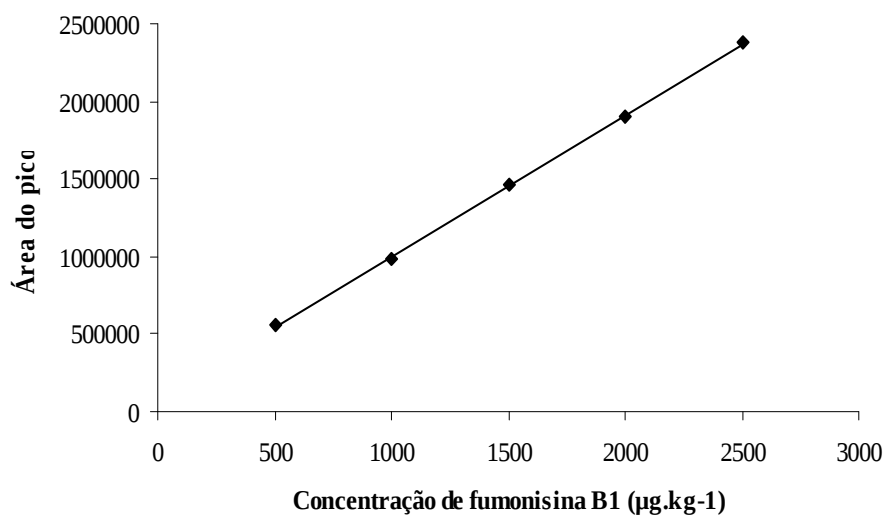
As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio-padrão. Empregou-se o software *Statistica 8.0* nos delineamentos do tipo Plackett & Burman e Composto Central Rotacional.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Com a finalidade de desenvolver um método analítico acessível, de fácil execução, economicamente viável, rápido, e com o emprego mínimo de solvente e amostra para a determinação de fumonisina B₁ em arroz, modificações foram realizadas no procedimento *QuEChERS*, empregado na determinação de multi-resíduos de pesticidas em vegetais, descrito por Anastassiades et al. (2003) e aceito pela AOAC (LEHOTAY, 2007).

A equação da reta de regressão linear da curva de calibração empregada para a quantificação de fumonisina B₁ foi $y = 911,17x + 92247$, onde y = área do pico e x = concentração de fumonisina B₁ (µg.kg⁻¹), com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9996 (Figura 1).

Figura 1 – Curva de calibração de fumonisina B₁ (500 – 2500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).



3.1. Delineamento Experimental de Plackett & Burman (PB)

A Tabela 5 apresenta a recuperação de fumonisina B₁ (%) em cada ensaio do delineamento de Plackett & Burman, observa-se que a recuperação foi de 30,1 a 106,1%, de acordo com as variações no método. A Tabela 6 apresenta os efeitos, de cada variável independente avaliada, na recuperação de fumonisina B₁ (%) do método.

Tabela 5 – Recuperação de fumonisina B₁ (%) em cada ensaio do delineamento de Plackett & Burman.

Ensaio	Recuperação (%) [*]
1	30,1
2	82,9
3	36,9
4	106,1
5	97,5
6	74,5
7	103,4
8	63,8
9	93,5
10	89,4
11	94,3
12	67,5
13	100,3
14	66,9
15	80,8
16	78,6
Ponto Central	95,6

*média (n=3)

Tabela 6 – Efeito de cada variável na recuperação de fumonisina B₁ (%).

	Variáveis	Efeitos	Erro padrão	t (6)	p - valor
	Média	79,2	3,98	19,9	0,000001
Extração	Acetonitrila (%)	-19,5	7,96	-2,4	0,049885
	Ácido acético (ml)	19,2	7,96	2,4	0,052509
	Agitação (min.)	-1,0	7,96	-0,1	0,907689
	Sulfato de sódio anidro(g)	21,1	7,96	2,6	0,038047
	Cloreto de sódio (g)	-1,7	7,96	-0,2	0,8391
	Agitação (min.)	11,6	7,96	1,5	0,195652
	Centrifugação (min.)	-7,8	7,96	-1,0	0,367051
Purificação	Sulfato de sódio anidro(g)	6,3	7,96	0,8	0,461292
	Celite® (g)	-2,8	7,96	-0,4	0,73812
	Agitação (min.)	-1,7	7,96	-0,2	0,841443
	Centrifugação (min.)	-6,9	7,96	-0,9	0,416886

A primeira etapa do *QuEChERS* consiste da extração, a qual envolve partição líquido-líquido e efeito *salting out*. À cada 1 g de amostra são adicionados 1 mL de acetonitrila (1% acidificada com ácido acético glacial) e 0,5 g da mistura dos sais sulfato de magnésio anidro e acetato de sódio (4:1), em um tubo de centrifugação, seguido de agitação vigorosa e centrifugação, ambas por 1 minuto (LEHOTAY, 2007).

No desenvolvimento, na etapa de extração manteve-se fixo a quantidade de amostra de 10 g e o volume de solução extratora de 20 mL. Ao invés da proporção 1:1 (amostra: solvente extrator) de acordo o procedimento de referência, optou-se pela proporção 1:2. Sospedra et al. (2010) reportaram recuperações entre 84 e 106% das micotoxinas tricotecenos em farinha de trigo ao empregaram na extração a proporção de 1:2 de farinha: solução de metanol e acetonitrila.

O emprego do solvente orgânico acetonitrila na extração da micotoxina foi em função de suas vantagens, como a habilidade em separar-se da fase aquosa após a adição dos sais no meio, sem a necessidade da utilização de solventes apolares; e a compatibilidade com a extração em fase sólida dispersiva e a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (PAYÁ et al., 2007).

O teor médio de umidade nas amostras de arroz foi de $7,6 \pm 0,6\%$, considerado baixo em comparação aos das amostras de frutas e vegetais (acima de 80%) geralmente analisadas pelo *QuEChERS*, assim optou-se pela substituição de acetonitrila por uma solução aquosa de acetonitrila como solvente extrator, a fim de introduzir água no meio.

Ao variar a concentração de acetonitrila de 50 a 60%, observou-se um efeito negativo significativo ($p \leq 0,05$) de 19,5% na recuperação do método, indicando que o maior teor de água no meio aumentou a eficiência da extração, possivelmente em função da hidratação do tecido celular, favorecendo assim a migração do solvente extrator para o interior da matriz, com também em função da micotoxina apresentar caráter polar.

Spanjer et al. (2008) verificaram que o aumento da porcentagem de água na solução de acetonitrila melhorou a eficiência da extração das fumonisinas em um método multi-micotoxinas. Sulyok et al. (2006), no desenvolvimento e validação de método analítico para a determinação de 39 micotoxinas em trigo e milho, reportaram recuperações para fumonisina B₁ de 83, 17 e 4%, quando empregou-se soluções de acetonitrila 50, 75 e 80%, respectivamente, no entanto, com a adição de 1% de ácido acético na solução de acetonitrila 75%, verificaram a maior recuperação para fumonisina B₁, de 105%.

No desenvolvimento do método, após a adição da solução aquosa de acetonitrila, realizou-se a acidificação do meio, de 0,5 a 0,75%. Com o aumento do volume de ácido

acético glacial, de 0,1 para 0,15 mL, houve um efeito positivo significativo ($p \leq 0,05$) de 19,2% na recuperação do método, demonstrando que a acidificação melhorou a eficiência da extração da micotoxina. Verificaram-se recuperações de fumoniosina B₁ entre 89 e 103% nos ensaios em que se empregaram solução de acetonitrila 50% e o maior volume de ácido acético glacial (Tabela 5). Desmarchelier et al. (2010) obtiveram recuperações acima de 80% para fumonisinas B₁ e B₂ após a adição de água nas amostras de cereais, em quantidade semelhante a do solvente empregado na extração, e adição de 0,5% de ácido acético no solvente extrator acetonitrila.

Nos primeiros testes realizados para avaliar a extração da micotoxina empregando o procedimento *QuEChERS*, optou-se pela não acidificação da acetonitrila, o que resultou em recuperações abaixo de 20% da fumonisina B₁, contudo, na elaboração do delineamento de Plackett & Burman, empregou-se uma acidificação de no mínimo 0,5% da solução extratora. Uma possível explicação para a eficiência da extração de fumonisina B₁ com a acidificação da acetonitrila seria que as fumonisinas B₁ apresentam caráter ácido, assim em meio neutro encontram-se no seu estado desprotonado, o que facilita interações com o grupo amino de componentes presentes na matriz, no entanto, em meio com pH ácido, os grupos ácidos da molécula de fumonisina B₁ estão protonados, conseqüentemente menor ou nenhuma interação ocorre, desta forma, o analito de interesse não se liga a componentes da matriz e permanece dissolvido no solvente extrator (MOL et al., 2008).

Avaliou-se a agitação em vórtex do sistema após a adição da solução de acetonitrila e ácido acético glacial, o que resultou em um efeito negativo de 1,0% na recuperação do método, porém não significativo ($p > 0,05$).

Em função da indisponibilidade laboratorial dos sais sulfato de magnésio anidro e acetato de sódio, estes foram substituídos por sulfato de sódio anidro e cloreto de sódio, respectivamente. A adição dos sais tem a finalidade de promover a partição líquido-líquido e o efeito *salting out* no sistema, desta forma, induzindo à separação das fases aquosa e orgânica, e permitindo a extração de compostos polares. O sulfato de sódio anidro se liga à água do meio, controlando o teor de água na fase orgânica, e a dissolução do cloreto de sódio na água livre do meio resulta na diminuição da solubilidade da micotoxina na água, desta forma, aumentando a distribuição da micotoxina no solvente orgânico, a acetonitrila.

Segundo Anastassiades et al. (2003), a hidratação do sal sulfato de magnésio anidro consiste em um processo exotérmico, desta forma, acredita-se que a liberação de calor da reação seja benéfica na etapa de extração.

O aumento na quantidade de sulfato de sódio anidro na etapa de extração, ou seja, de 1 para 4 g, resultou em um efeito positivo significativo ($p \leq 0,05$) de 21,1% na recuperação do método, no entanto, o aumento na quantidade de cloreto de sódio, de 0,5 para 1,0 g, resultou em um efeito negativo de 1,7% na recuperação, sugerindo a utilização da menor quantidade de cloreto de sódio na etapa de extração.

Anastassiades et al. (2003) verificaram que o aumento na quantidade de cloreto de sódio resultou em redução na recuperação de pesticidas em vegetais. A quantidade de cloreto de sódio adicionada ao meio tem uma forte influência na separação das fases aquosa e orgânica, e em altas quantidades resulta em uma fase orgânica com menor teor de água, assim, menos receptiva para os compostos polares, desta forma, é possível controlar a polaridade da etapa de extração variando a concentração deste sal no meio.

Após a adição dos sais, variou-se a agitação em vórtex do sistema entre 1 e 3 minutos, e a centrifugação a 7500 rpm de 2 a 4 minutos, no entanto não houveram efeitos significativos ($p > 0,05$) na recuperação do método com estas variações, desta forma, os menores tempos avaliados tanto de agitação quanto de centrifugação puderam ser estabelecidos, a fim de reduzir o tempo das análises.

A segunda etapa do *QuEChERS* consiste na purificação em fase sólida dispersiva do extrato obtido na etapa de extração. À cada 1 mL do sobrenadante (fase orgânica) são adicionados 200 mg da mistura de sulfato de magnésio anidro e o adsorvente de troca iônica fraca PSA (amina primária secundária) na proporção de 3:1, em tubo de centrifuga, seguido de agitação por 30 segundos e centrifugação por 1 minuto (LEHOTAY, 2007). O sal sulfato de magnésio anidro tem a função de remover a água remanescente no extrato, e o PSA de remover componentes polares da matriz, através de ligações do tipo ponte de hidrogênio, como ácidos orgânicos e açúcares, além de ácidos graxos e pigmentos, promovendo a limpeza do extrato (ANASTASSIADES et al., 2003).

Uma vez que a molécula de fumonisina B₁ apresenta grupos carboxílicos e grupos hidroxilas em sua estrutura química, no desenvolvimento do método substituiu-se o adsorvente PSA por Celite[®], em função da possibilidade de interações entre a molécula de fumonisina B₁ e o PSA. Trebstein et al. (2009) relataram baixa recuperação para a micotoxina zearalenona (aproximadamente 20%) ao utilizarem o PSA na etapa de purificação, provavelmente devido às ligações do tipo ponte de hidrogênio entre os grupos hidroxila da molécula de zearalenona e o PSA. Entretanto, Soares e Rodriguez-Amaya (1985), Furlong e Soares (1995), e Caldas et al. (2002) empregaram Celite[®] na etapa de purificação na

investigação das micotoxinas ocratoxina, tricotecenos, e aflatoxinas e ocratoxina, respectivamente, e obtiveram porcentagens de recuperação satisfatórias.

O sal sulfato de sódio anidro adicionado na etapa de purificação, de 0,3 a 0,7 g, resultou em um efeito positivo de 6,3% na recuperação do método, porém não significativo ($p > 0,05$). O aumento na quantidade de Celite[®], de 0,1 a 0,2 g, promoveu um efeito negativo de 2,8% na recuperação do método, porém também não significativo ($p > 0,05$), sugerindo a utilização pequenas quantidades do sulfato de sódio anidro e do adsorvente na etapa de purificação. A substituição do adsorvente PSA pela Celite[®] mostrou-se adequada, uma vez que se obtiveram extratos límpidos e recuperações satisfatórias.

Na etapa de purificação, com o aumento do tempo de agitação, de 30 a 60 segundos, verificou-se um efeito negativo de 1,7% na recuperação do método, no entanto, não significativo ($p > 0,05$). Ao variar o tempo de centrifugação, de 2 a 4 minutos, observou-se um efeito negativo de 6,9% na recuperação, não significativo ($p > 0,05$), indicando que nesta etapa tanto o tempo de agitação quanto de centrifugação há de ser o menor.

Com as modificações no procedimento *QuEChERS*, de acordo com o delineamento de Plackett & Burman, verificou-se recuperações satisfatórias, entre 74,5 e 106,1%, demonstrando a possibilidade da aplicação do método para a determinação de fumonisina B₁ em amostras arroz, uma vez que se aceita porcentagens de recuperação na faixa entre 70 e 110%, quando se tem concentrações superiores a 500 µg.kg⁻¹ de fumonisina B₁ (BRASIL, 2009).

3.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Com a finalidade de desenvolver um método analítico rápido, barato e com menor geração de resíduos orgânicos, a partir dos efeitos calculados através do delineamento Plackett & Burman fixou-se 8 variáveis na menor quantidade e tempo avaliados. Na etapa de extração, manteve-se a agitação em 1 minuto, cloreto de sódio em 0,5 g e a centrifugação em 2 minutos, e na etapa de purificação, sulfato de sódio anidro em 0,3 g, Celite[®] em 0,1 g, a agitação em 30 segundos e a centrifugação em 2 minutos.

No entanto, as variáveis da etapa de extração - concentração de acetonitrila (%), volume de ácido acético glacial (mL) e quantidade de sulfato de sódio anidro (g), foram as que apresentaram o maior impacto sobre a recuperação do método (Tabela 6), contudo, realizou-se um delineamento do tipo Composto Central Rotacional a fim de definir as condições de cada uma destas variáveis.

A Tabela 7 apresenta a recuperação (%) de fumonisina B₁ em cada ensaio do Delineamento Composto Central Rotacional, verificou-se que a recuperação foi de 57,5 a 123,2%, de acordo com as variações na concentração de acetonitrila da solução empregada como solvente extrator, na acidificação do meio e na quantidade de sulfato de sódio anidro adicionada.

Tabela 7 – Recuperação (%) de fumonisina B₁ em cada ensaio do Delineamento Composto Central Rotacional.

Ensaio	Recuperação (%)[*]
1	75,6 ± 13,2
2	57,5 ± 16,7
3	113,8 ± 9,5
4	92,3 ± 16,1
5	86,4 ± 11,0
6	72,3 ± 0,1
7	123,2 ± 16,1
8	87,8 ± 4,5
9	111,2 ± 16,5
10	76,3 ± 0,7
11	68,3 ± 2,1
12	93,7 ± 15,8
13	79,1 ± 3,6
14	87,9 ± 3,7
<i>Ponto Central</i>	
15	91,3
16	89,8
17	85,7

^{*}média ± desvio-padrão (n=3)

Através dos resultados de recuperação (%) obtidos foram calculados os coeficientes de regressão, onde os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos à letra Q (Tabela 8).

Tabela 8 – Coeficientes de regressão para a porcentagem de recuperação de fumonisina B₁.

Parâmetros	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t (7)	p - valor
Média	88,8	3,8	23,4	0,000000
X₁ (L)	-10,8	1,8	-6,1	0,000513
X₁(Q)	2,3	2,0	1,2	0,279769
X₂ (L)	12,3	1,8	6,9	0,000235
X₂ (Q)	-2,2	2,0	-1,1	0,298377
X₄ (L)	3,3	1,8	1,9	0,105257
X₄ (Q)	-1,3	2,0	-0,7	0,516976
X₁X₂	-3,1	2,3	-1,3	0,230514
X₁X₄	-1,3	2,3	-0,5	0,605045
X₂X₄	-2,6	2,3	-1,1	0,308196

X₁: Concentração de Acetonitrila (%); X₂: Ácido Acético Glacial (mL); X₄: Sulfato de Sódio Anidro (g); X₁X₂: interação entre concentração de acetonitrila (%) e ácido acético glacial (mL); X₁X₄: interação entre concentração de acetonitrila (%) e sulfato de sódio anidro (g); X₂X₄: interação entre ácido acético glacial (mL) e sulfato de sódio anidro (g).

Observou-se que apenas os termos lineares das variáveis foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 10% ($p \leq 0,1$), e as interações entre as variáveis não foram estatisticamente significativas. Assim, os parâmetros com coeficientes de regressão não significativos foram excluídos, e então obtido um modelo matemático reparametrizado (Tabela 9).

Tabela 9 – Coeficientes de regressão estatisticamente significativos para a porcentagem de recuperação de fumonisina B₁.

Parâmetros	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t (13)	p - valor
Média	87,8	1,7	51,9	0,000000
X₁ (L)	-10,8	1,9	-5,7	0,000069
X₂ (L)	12,3	1,9	6,5	0,000020
X₄ (L)	3,3	1,9	1,8	0,101935

X₁: Concentração de Acetonitrila (%); X₂: Ácido Acético Glacial (mL); X₄: Sulfato de Sódio Anidro (g).

A equação a seguir descreve o modelo matemático codificado da porcentagem de recuperação de fumonisina B₁ em função das variáveis independentes – concentração de acetonitrila (%), volume de ácido acético glacial (mL) e quantidade sulfato de sódio anidro (g), reparametrizado a um nível de significância de 10%:

$$\% \text{ Recuperação de Fumonisina B}_1 = 87,8 - 10,8 X_1 + 12,3 X_2 + 3,3 X_4$$

A partir da análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 10, concluiu-se que o modelo codificado de 1ª ordem que descreve a porcentagem de recuperação de fumonisina B₁ em função das variáveis estudadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, é adequado, pois a regressão foi altamente significativa, cujo valor de *F calculado* (26,2) foi 10 vezes superior ao do *F tabelado* (2,56), e porcentagem de variação explicada foi de 85,8% para a recuperação do método.

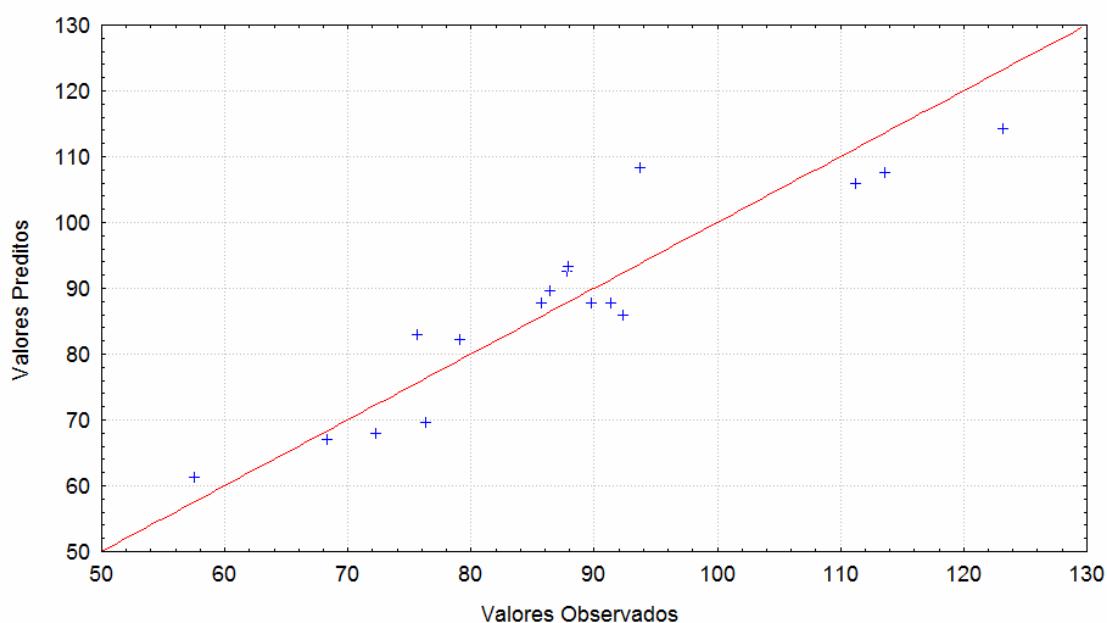
Tabela 10 – Análise de variância para a porcentagem de recuperação de fumonisina B₁.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	<i>F calculado</i>	<i>p</i> - valor
Regressão	3809,7	3	1269,9	26,2	0,0001
Resíduos	629,7	13	48,4		
Total	4439,4	16			

% Variação Explicada (R^2) = 85,8; $F_{3; 13; 0,10} = 2,56$.

A Figura 2 apresenta os valores observados experimentalmente e os valores preditos pelo modelo matemático codificado de 1ª ordem, associados à recuperação (%) de fumonisina B₁ do método. Verificou-se uma boa concordância entre os valores, uma vez que a ANOVA indicou uma porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo de 85,8%, considerada boa, demonstrando que o modelo se ajusta aos dados experimentais.

Figura 2 – Valores observados experimentalmente em função dos valores preditos pelo modelo para a porcentagem de recuperação de fumonisina B₁ do método.



Uma vez que, pela análise de variância, verificou-se regressão altamente significativa e porcentagem de variação explicada (R^2) satisfatória, permitiu-se a construção das superfícies de respostas e as curvas de contorno (Figuras 3, 4 e 5).

Figura 3 – Superfície de resposta e curva de contorno para a recuperação (%) de fumonisina B₁ em função da concentração de acetonitrila (%) e o volume de ácido acético glacial (mL).

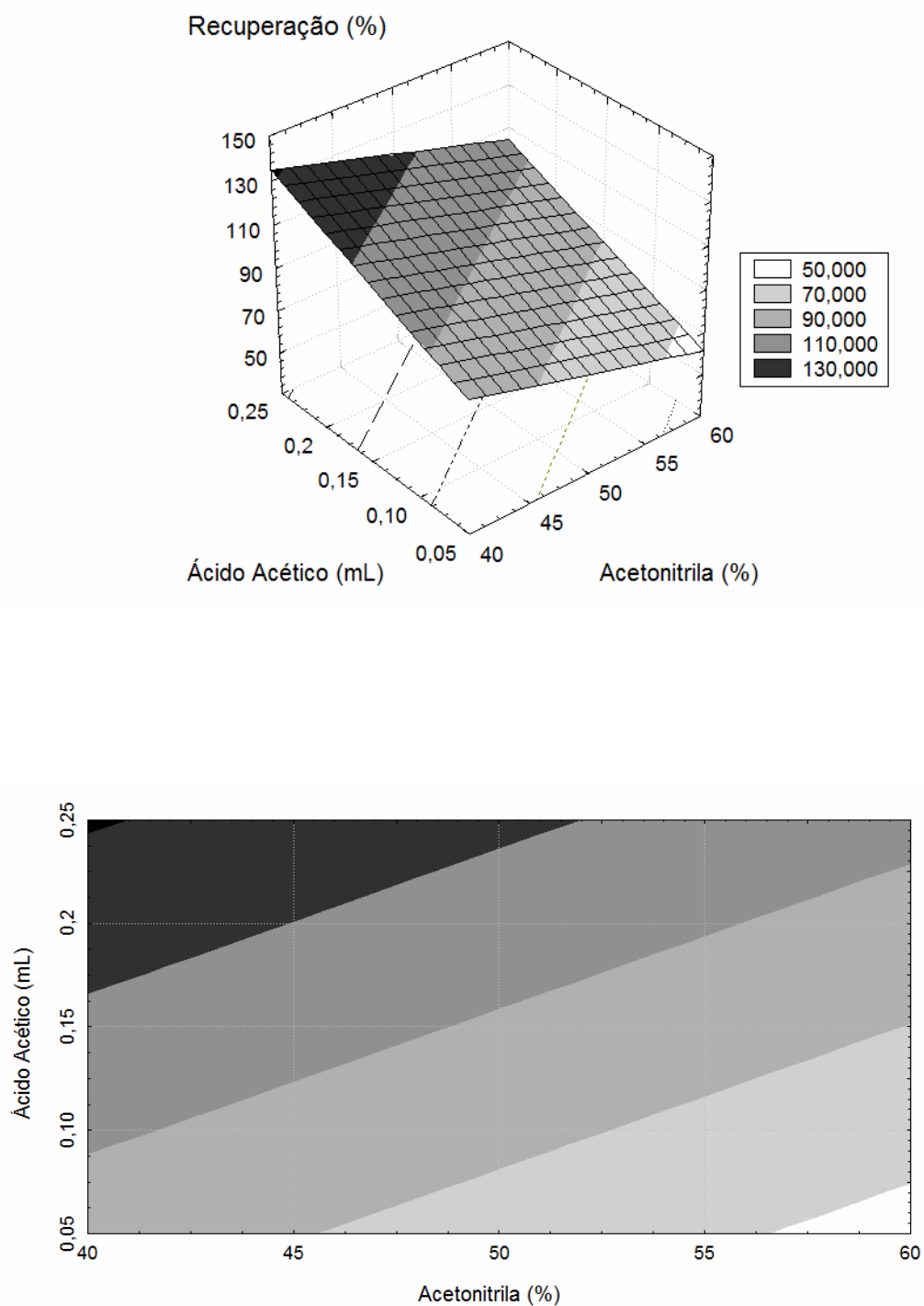


Figura 4 – Superfície de resposta e curva de contorno para a recuperação (%) de fumonisina B₁ em função da concentração de acetonitrila (%) e a quantidade de sulfato de sódio anidro (g).

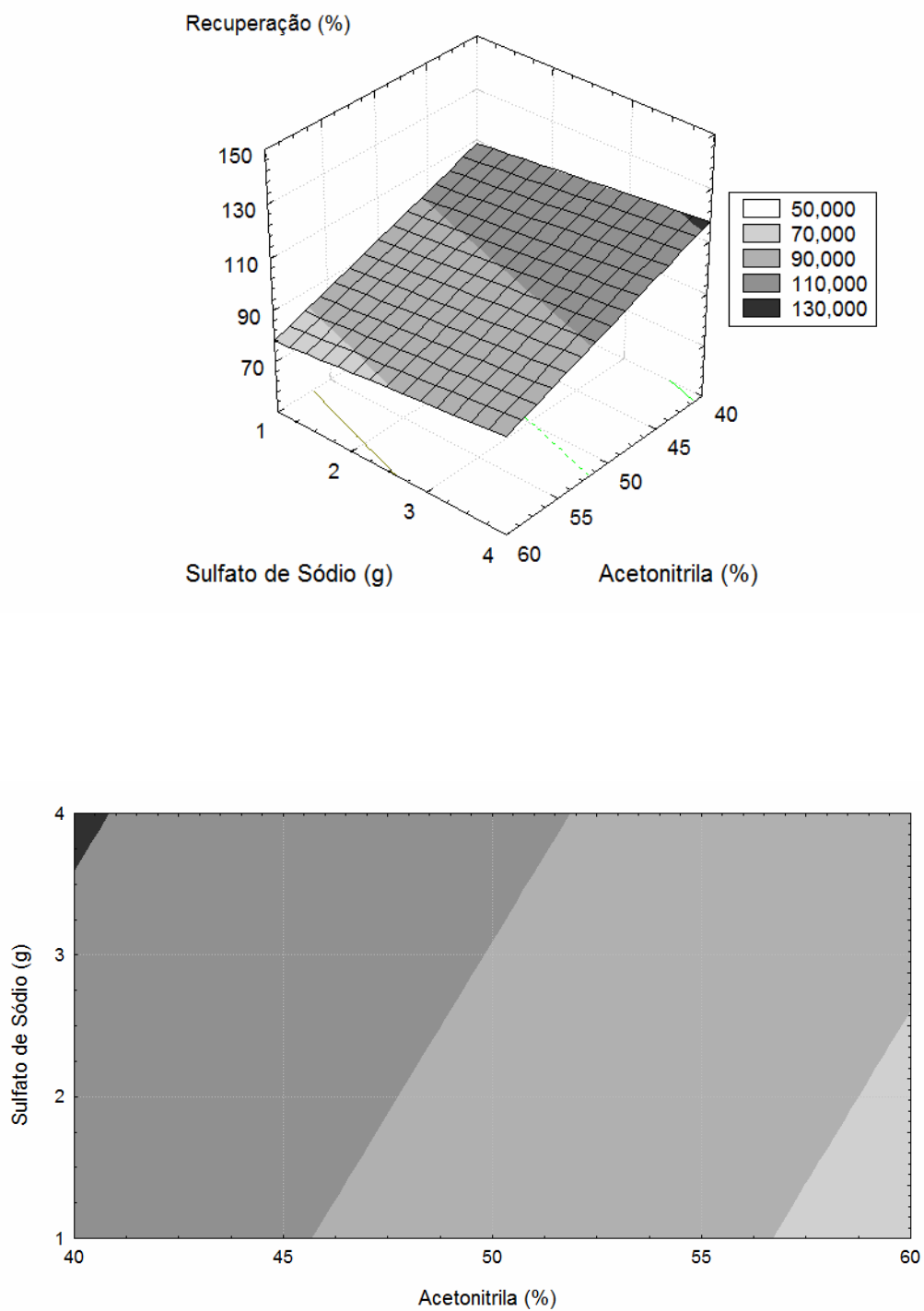
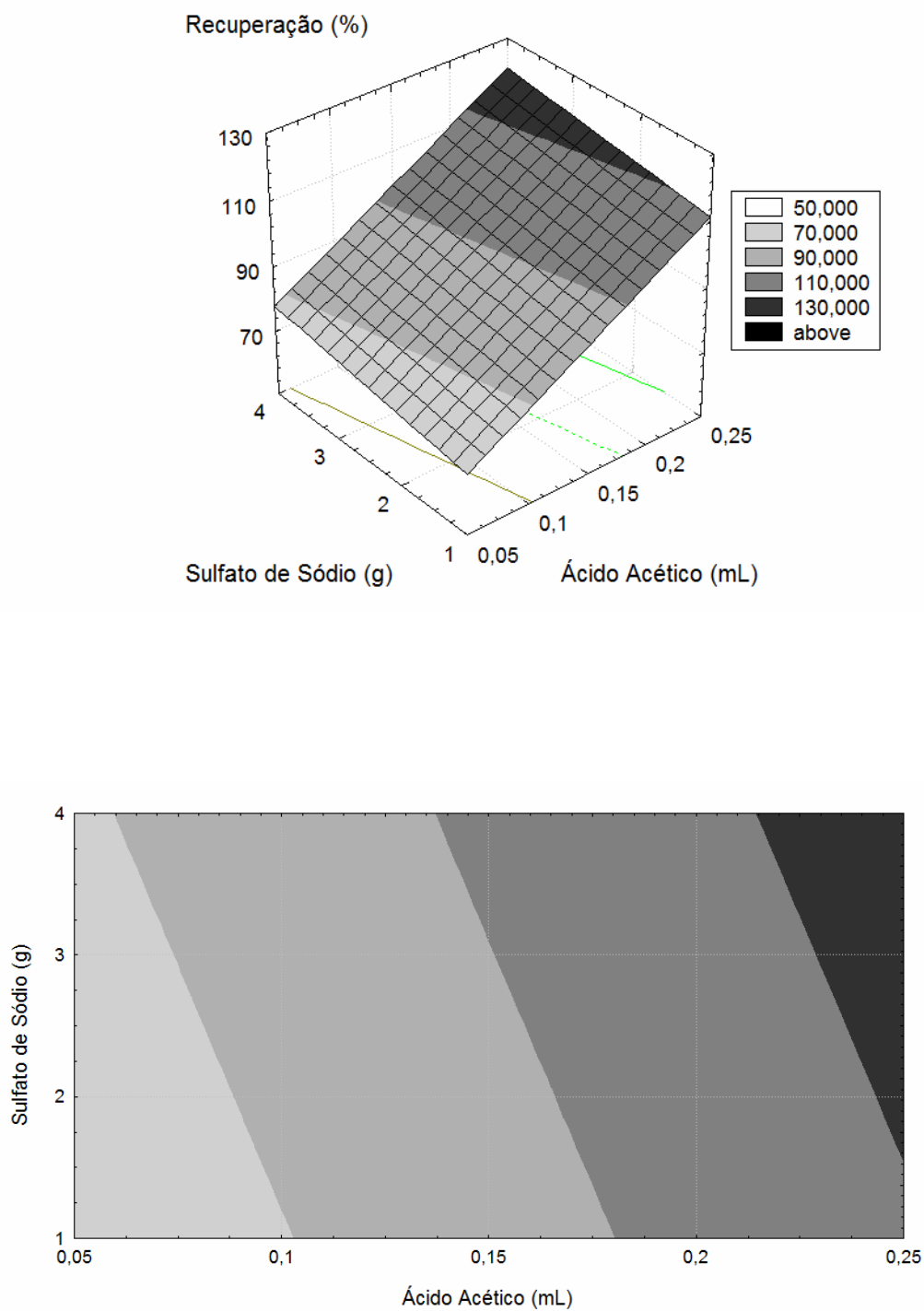


Figura 5 – Superfície de resposta e curva de contorno para a recuperação (%) de fumonisina B₁ em função do volume de ácido acético glacial (mL) e a quantidade de sulfato de sódio anidro (g).



Através da análise das superfícies de respostas e das curvas de contorno geradas pelo modelo codificado verificou-se que a porcentagem de recuperação do método foi influenciada pelas três variáveis independentes avaliadas pelo DCCR.

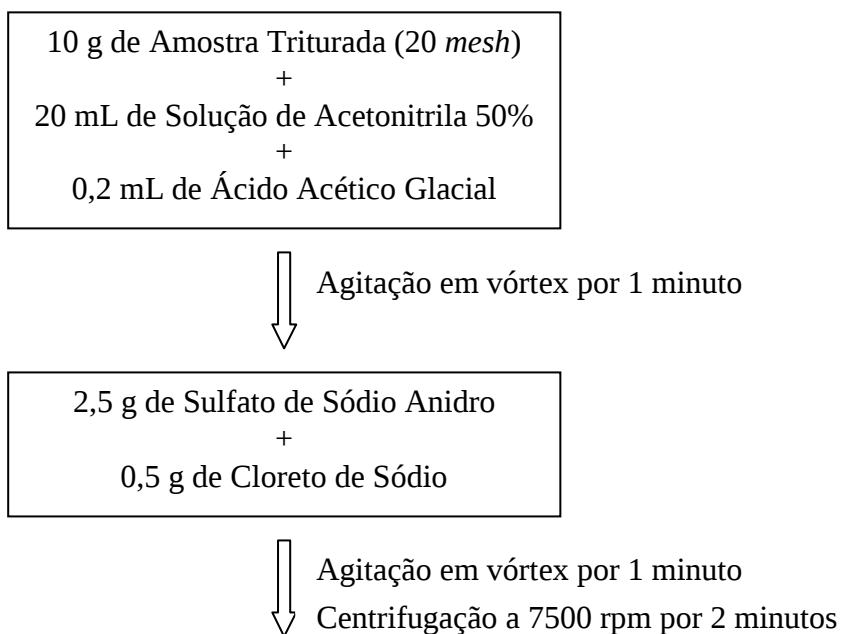
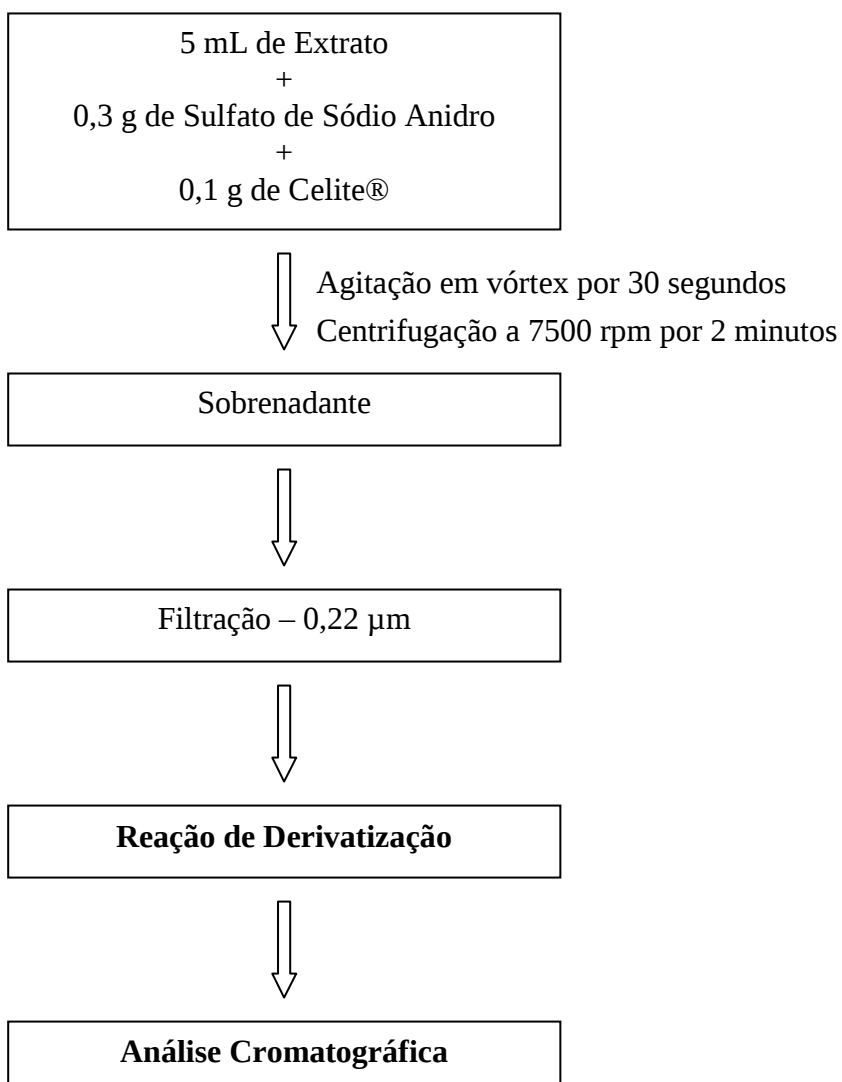
O aumento na concentração de acetonitrila da solução extratora resultou em menores recuperações (%) de fumonisina B₁, o que implica na necessidade de uma quantidade mínima de água no meio para uma extração eficiente da micotoxina (Figuras 2 e 3). Entretanto, o aumento do volume de ácido acético glacial adicionado resultou em maiores recuperações do método, demonstrando que a acidificação do meio é fundamental na extração de fumonisina B₁ (Figuras 2 e 4).

O aumento da porcentagem de recuperação do método também foi decorrente do sulfato de sódio anidro no meio, quanto maior a quantidade adicionada maior foi a recuperação (%) da micotoxina (Figuras 3 e 4), destacando a importância desta variável na etapa de extração do método *QuEChERS*.

Considerando os critérios de desempenho que os métodos analíticos devem atender para a determinação de micotoxinas em alimentos, estabelecidos pela Comunidade Européia, e no Brasil, pela Consulta Pública nº 100 de 21 de Dezembro de 2009, se aceita recuperações entre 70 e 110% para fumonisina B₁ em concentrações superiores a 500 µg.kg⁻¹ (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2005; BRASIL, 2009). A partir dos gráficos de superfícies de respostas e das curvas de contorno, observou-se que o emprego de solução extratora composta por acetonitrila na concentração entre 40 e 55%, volume de ácido acético glacial entre 0,1 e 0,2 mL, e a quantidade de sulfato de sódio anidro entre 1 e 3 g, resultariam em recuperações (%) de fumonisina B₁ dentro da faixa aceitável (70-110%).

Avaliando os resultados dos delineamentos de Plackett & Burman e Composto Central Rotacional definiu-se as condições de cada variável das etapas de extração e purificação do método, conforme apresentado na Figura 6. Através do modelo codificado de 1ª ordem é prevista uma porcentagem de recuperação pelo método proposto de 100,1% para a micotoxina, apesar de saber da existência de desvios entre os resultados experimentais e os preditos, uma vez que a porcentagem de variação explicada (R^2) foi de 85,8%.

Os resultados obtidos indicaram que através da metodologia de planejamento experimental associada à análise de superfície de resposta foi possível desenvolver um método analítico com porcentagens de recuperação satisfatórias.

Figura 6 – Método analítico para a determinação de fumonisina B₁ em arroz.**Extração****Purificação**

4. CONCLUSÃO

A partir dos delineamentos de Plackett & Burman e Composto Central Rotacional obteve-se um novo método analítico para a determinação de fumonisina B₁ em arroz por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. Um método de fácil execução, economicamente viável, rápido, com menor geração de resíduos orgânicos e com recuperação acima de 95% para a micotoxina avaliada.

5. REFERÊNCIAS

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18th ed. Gaithersburg: AOAC, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 100, de 21 de Dezembro de 2009. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 22 dez. 2009. Seção 1, p. 90. Disponível em: <http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=90&data=22/12/2009>. Acesso em: 4 fev. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. p. 758.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7 de 18 de Fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados para micotixnas em alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 22 fev. 2011. Seção 1, p. 72. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html. Acesso em: 10 maio 2011.

CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J.N. Aflatoxins and ochratoxin a in food and the risks to human health. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CUNHA, S.C.; FERNANDES, J.O. Development and validation of a method based on a QueChERS procedure and heart-cutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 600-609, 2010.

DALL'ASTA, C.; FALAVIGNA, C.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. In vitro digestion assay for determination of hidden fumonisin in maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12042-12047, 2010.

DESMARCHELIER, A.; OBERSON, J.M.; TELLA, P.; GREMAUD, E.; SEEFELDER, W.; MOTTIER, P. Development and comparison of two multiresíduos methods for the nalysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7510-7519, 2010.

FRENICH, A.G.; VIDAL, J.L.M.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; AGUILERA-LUIZ M.M. Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 117, p. 705-712, 2009.

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

LEHOTAY, S.J. Determination of pesticide residues in food by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate; collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 2, p. 485-520, 2007.

LINO, C.M; SILVA, L.J.G.; 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.

MOL, H.G.J.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ZOMER, P.; RIJIK, T.C.; STOLKER, A.A.M.; MULDER, P.J. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of

pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 9450-9459, 2008.

PARK, J.W.; CHOI, S.Y.; HWANG, H.J.; KIM, Y.B. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 305-314, 2005.

PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M.; GLEADLE, A.E.. Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 2, p. 187-191, 1997.

PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D., SIGALOVA, I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A. Analysis of pesticide residues using the quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1697-1714, 2007.

RASMUSSEN, R.R.; STORM, I.M.L.D.; RASMUSSEN, P.H.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, K.F. Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 765-776, 2010.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358p.

SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A., LOMBAERT, G.A. Studies on extraction of fumonisins from rice, corn-based foods and beans. **Mycotoxin Research**, v. 15, p. 50-60, 1999.

SEO, E.; YOON, Y.; KIM, K.; SHIM, W.B.; KUZMINA, N.; OH, K.S.O.; LEE, J.O.; KIM, D.S.; SUH, J.; LEE, S.H.; CHUNG, K.H.; CHUNG D.H. Fumonisins B₁ e B₂ in agricultural products consumed in South Korea: an exposure assessment. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 436-440, 2009.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice, and cassava. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 68, n. 6, p. 1129-1130, 1985.

SOSPEDRA, I.; BLESÁ, J.; SORIANO, J.M.; MAÑES, J. Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1437–1440, 2010.

SPANJER, M.C.; RENSEN, P.M.; SCHOLTEN, J.M. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanuts, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 4, p. 472-489, 2008.

SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, 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, p. 2649-2659, 2006.

SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P.W.; VAN SCHALKWYK, D.J. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 3, p. 688-696, 1996.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Directive 2005/38/EC of 6 June 2005. Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels of *Fusarium* toxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 7 Jun. 2005. L 143/18.

TREBSTEIN, A.; LAUBER, U.; HUMPF, H.U. Analysis of *Fusarium* toxins via HPLC-MS/MS multimethods: matrix effects and strategies for compensation. **Mycotoxin Research**, v. 25, p. 201-213, 2009.

VACLAVIK, L.; ZACHARIASOVA, M.; HRBEK, V.; HAJŠLOVA, J. Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. **Talanta**, v. 82, p. 1950-1957, 2010.

ZACHARIASOVA, M.; LACINA, O.; MALACHOVA, A.; KOSTELANSKA, M.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; HAJŠLOVA, J. Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 51-61, 2010.

WU, J.; ZHAO, R.; CHEN, B.; YANG, M. Determination of zearalenone in barley by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection and natural occurrence of zearalenone in functional food. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1508-1511, 2011.

CAPÍTULO IV – VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE FUMONISINA B₁ EM ARROZ POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os parâmetros de desempenho de um novo método analítico para a determinação de fumonisina B₁ em arroz, empregando derivatização pré-coluna e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. Foram avaliados os critérios de desempenho do método – seletividade, linearidade, efeito de matriz, limites de detecção e de quantificação, exatidão, precisão e robustez. Avaliou-se o desempenho do novo método analítico em amostras de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral. A partir da análise dos cromatogramas obtidos verificou-se seletividade do método, pois no mesmo tempo de retenção da micotoxina não eluiu nenhum interferente. Verificou-se a normalidade dos resíduos de regressão pelo teste de Ryan-Joiner, a homoscedasticidade pelo teste de Brown-Forsythe e a independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin-Watson, como também regressão linear significativa ($p < 0,001$) e desvio de linearidade não significativo ($p > 0,05$), após a remoção de valores extremos detectados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, indicando a linearidade das curvas de calibração nos extratos das amostras, na faixa entre 100 e 2500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Através da comparação entre as inclinações e interseções da curva de fumonisina B₁ em solvente e das curvas em extratos de arroz verificou-se o efeito de matriz. Os limites de detecção e de quantificação foram de 50 e 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente. O método apresentou porcentagens de recuperação de 100,48, 104,97, 87,60 e 91,76% para o arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, respectivamente. Os ensaios de repetitividade indicaram a precisão do método, com baixos valores de desvio padrão relativo. Variações nas condições nominais de alguns parâmetros das etapas de extração e purificação, não afetaram a determinação de fumonisina B₁ pelo método, demonstrando que o novo método é robusto.

Palavras-chave: Fumonisina B₁; Validação Intralaboratorial; Arroz; CLAE.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the performance parameters of a new analytical method for determination of fumonisin B₁ mycotoxin in rice samples, employed pre-column derivatization and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The performance criteria of the method - selectivity, linearity, matrix effect, detection and quantification limits, accuracy, precision and robustness, were evaluated. The performance of the new analytical method was evaluated in polished, polished parboiled, whole and whole parboiled rice samples. From analysis of the chromatograms obtained observed selectivity of the method, because in the mycotoxin retention time there wasn't any interference. The normality of the regression residuals was verified by Ryan-Joiner test, homoscedasticity by Brown-Forsythe test and independence of the regression residuals by Durbin-Watson test, as also significant linear regression ($p < 0.001$) and linearity deviation no significant ($p > 0.05$), after removal of the outliers detected by Jackknife standardized residuals test, indicating linearity of the calibration curves in the solvent and rice extracts in the range between 100 and 2500 µg.kg⁻¹. By comparing of the slopes and intersections of the curve of fumonisin B₁ in solvent and rice extracts observed matrix effect. The detection and quantification limits of method were 50 and 100 µg.kg⁻¹, respectively. The method recovery was of 100.48, 104.97, 87.60 and 91.76% for polished, polished parboiled, whole and whole parboiled, respectively. The repeatability tests indicated precision of the method, with low relative standard deviation values. Variations in some method parameters didn't influence in determination of the fumonisin B₁, demonstrating that the new method is robust, because the results weren't affected by changes in their nominal conditions.

Keywords: Fumonisin B₁; In-house Validation; Rice; HPLC.

1. INTRODUÇÃO

A validação de métodos analíticos consiste na confirmação e fornecimento de evidência de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ABNT, 2005), e pode ser de dois tipos – *intralaboratorial*, que consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um novo método que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar se o método adotado de outras fontes está sendo apropriado; ou *interlaboratorial*, que é utilizada para verificar como o método analítico se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, demonstrando a reprodutibilidade e a incerteza do método (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros de desempenho geralmente empregados na validação do método analítico são – seletividade, linearidade e efeito de matriz, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

A seletividade é a capacidade de um método analítico produzir respostas para vários analitos, mas que permita a distinção da resposta de um analito específico na presença de outras (INMETRO, 2007). A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como excipientes, impurezas, produtos de degradação e outros compostos de características similares à do analito de interesse, que possam estarem presentes na matriz analisada, sendo o primeiro parâmetro a ser avaliado na validação de um método analítico (RIBANI et al., 2004).

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir respostas que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras, em uma dada faixa de concentração, podendo ser obtida por padronização interna ou externa (INMETRO, 2007).

O limite de detecção representa a menor concentração do analito de interesse que possa ser detectada, mas não necessariamente quantificada, podendo ser calculado pelo método visual, relação sinal-ruído ou método baseado em parâmetros da curva de calibração (RIBANI et al., 2004).

O limite de quantificação representa a menor concentração do analito de interesse que possa ser determinada com um certo nível aceitável de exatidão e precisão. Na prática, corresponde normalmente ao nível mais baixo da curva de calibração (INMETRO, 2007).

A exatidão de um método analítico é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro, e geralmente é avaliada pelo emprego de materiais de referência certificados, método de adição de padrão, ensaios de recuperação, comparações interlaboratoriais, e comparação entre métodos, cujos resultados obtidos utilizando o método em desenvolvimento são comparados com os obtidos pelo método de referência (RIBANI, 2004; INMETRO, 2007).

A precisão de um método analítico representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas, e as formas mais comuns de expressá-la é por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão (INMETRO, 2007).

A repetitividade indica a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, sob as mesmas condições de medição – mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento sob as mesmas condições, mesmo local, e repetições em um curto intervalo de tempo. A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório em função de diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A reprodutibilidade é a concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas, como diferentes analistas, local, equipamentos, etc (RIBANI et al., 2004).

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações, demonstrando ser robusto quando não for afetado por pequena e deliberada modificação em seus parâmetros (INMETRO, 2007).

Diferentes organizações nacionais e internacionais, como AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), EC (*The Commission of the European Communities*), EURACHEM (*A Focus for Analytical Chemistry in Europe*), FDA (*Food and Drug Administration*), ICH (*International Conference on Harmonization*), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), ISO (*International Standards Organization*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), NATA (*National Association of Testing Authorities – Australia*), USP (*United States Pharmacopeia*), entre outras, apresentam as especificações sobre os procedimentos sobre a avaliação de cada um dos parâmetros de validação.

Com o propósito de garantir que o método empregado apresente resultados confiáveis sobre a amostra, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros de desempenho – seletividade, linearidade e efeito de matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão e robustez, do novo método analítico para a determinação de fumonisina B₁ em arroz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Arroz

Amostras de arroz do tipo 1, classe longo fino, grupo beneficiado e subgrupos polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, acondicionadas em embalagem de 1 kg, foram adquiridas no município de Araraquara, SP, no ano de 2010. O cereal foi triturado em multi processador (Arno[®], SP, Brasil) até obtenção de amostra homogênea, passado por peneira de 20 *mesh* e acondicionado em potes plásticos, em temperatura ambiente, até o momento das análises, as quais foram realizadas no mesmo dia da trituração do cereal.

2.1.2. Padrão e Reagentes

O padrão de fumonisina B₁ (98% de pureza) e o reagente de derivatização *orto*-ftaldialdeído (OPA) foram adquiridos da *Sigma-Aldrich, Inc.* (St. Louis, MO, USA). Acetonitrila, ácido acético glacial e metanol, todos grau CLAE, foram adquiridos da *J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc.* (Phillipsburg, NJ, USA). Ácido fosfórico e tetraborato de sódio foram adquiridos da *LabSynth* (Diadema, SP, Brasil), fosfato monossódico 1-hidrato e cloreto de sódio da *Merck S.A.* (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 2-mercaptoetanol da *Vetec* (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Sulfato de sódio anidro da *Qhemis* (Indaiatuba, SP, Brasil) e Celite[®] (Hyflo SuperCel) da *Almeria S.A.* (Guadalajara, México). A água utilizada nas análises cromatográficas foi obtida através de sistema de ultra-purificação *Millipore MilliQ system* (Millipore, Milford, MA, USA).

2.1.3. Solução Padrão de Fumonisina B₁

O padrão de fumonisina B₁ (5 mg) foi dissolvido em 5 mL de solução de acetonitrila:água (1:1) obtendo uma solução estoque de 1000 µg.mL⁻¹, de acordo com a AOAC (2005). A partir desta solução, preparou-se solução trabalho de 20 µg.mL⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar, envoltos em alumínio, e estocadas a -18°C.

2.2. Métodos

2.2.1. Determinação de Fumonisina B₁

2.2.1.1. Extração e Purificação

Na extração, em um tubo de centrifugação de polipropileno de 50 mL Nalgene[®] (Thermo Scientific, Rochester, NY, USA), foram adicionados 10 g de amostra de arroz, 20 mL de solução de acetonitrila 50%, e 0,2 mL de ácido acético glacial, seguido de agitação em

vórtex por 1 minuto, e posterior adição de 2,5 g de sulfato de sódio anidro e 0,5 g de cloreto de sódio, novamente agitação em vórtex por 1 minuto e centrifugação à 7500 rpm durante 2 minutos.

Na etapa de purificação, 5 mL do extrato obtido na etapa de extração, 0,3 g de sulfato de sódio anidro e 0,1 g de Celite[®] foram adicionados à um tubo de centrifugação de polipropileno de 50 mL, e este agitado em vórtex por 30 segundos e centrifugado à 7500 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm Millex[®] (Millipore, Barueri, SP, Brasil), e então realizada a reação de derivatização.

2.2.1.2. Derivatização

A reação de derivatização da fumonisina B₁ foi de acordo com a AOAC (2005). O reagente de derivatização foi preparado empregando-se 40 mg de OPA, este dissolvido em 1 mL de metanol, diluídos com 5 mL de solução de tetraborato de sódio 0,1 M (pH 8,9 – 9,1), e então adicionados 50 µL de 2-mercaptoetanol. O reagente foi estocado em frasco âmbar, envolto em papel de alumínio, protegido da luz e em temperatura ambiente, por no máximo até uma semana.

Alíquota de 225 µL do reagente de derivatização foi adicionada à um *vial* de 1,5 mL contendo 25 µL de extrato da amostra purificado, e então mantidos em banho de ultra-som por 30 segundos em temperatura ambiente e protegidos da luz. Dentro de 4 minutos, após a adição do reagente de derivatização, realizou-se a injeção no cromatógrafo a líquido.

2.2.1.3. Análise Cromatográfica

Na separação, detecção e quantificação da fumonisina B₁ utilizou-se um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kioto, Japão), com sistema quaternário de bombeamento de solvente, modelo LC 10AT VP, detector de fluorescência RF 10A XL em comprimentos de onda de 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão), injetor automático SIL 10A, e coluna cromatográfica ODS Hypersil (250 x 4,6 mm; partículas de 5 µm) (Thermo, Reino Unido). A temperatura da coluna durante as análises manteve-se em 20°C, e o tempo total de corrida foi de 20 minutos. A fase móvel empregada foi acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico, na proporção 44:56, respectivamente, em eluição isocrática, vazão de 1,0 mL.min⁻¹, e volume de injeção de 10 µL.

2.2.1.4. Detecção e Quantificação de Fumonisina B₁

A detecção de fumonisina B₁ foi realizada pela comparação entre os tempos de retenção da amostra e do padrão (AOAC, 2005), de $13,5 \pm 0,5$ minutos, e a quantificação através do método de padronização externa, utilizando-se as áreas dos picos cromatográficos. Empregaram-se curvas de calibração em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, na faixa de 100 a 2500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, cuja linearidade e efeito de matriz foram comprovados.

2.2.2. Validação Intralaboratorial

2.2.2.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação entre os cromatogramas dos extratos de arroz dos subgrupos polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral adicionados de padrão de fumonisina B₁ e os cromatogramas dos extratos de arroz dos mesmos subgrupos isentos de fumonisina B₁ (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2011), como também cromatogramas de amostras de arroz naturalmente contaminadas por fumonisina B₁.

2.2.2.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada de acordo com o procedimento descrito por Souza e Junqueira, 2005, pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Prepararam-se curvas de calibração de fumoniosina B₁ em solvente – acetonitrila: água (1:1), e em matriz – extratos purificados de amostras de arroz dos subgrupos polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, livres da micotoxina, adicionados de solução padrão de fumonisina B₁.

Foram preparadas três curvas de calibração de fumonisina B₁ em solvente, e três curvas de fumonisina B₁ para cada extrato de arroz dos subgrupos estudados, em diferentes dias, nos níveis de 100, 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 μg de fumonisina B₁ por kg de arroz, sendo cada nível em três replicatas independentes, analisados em ordem aleatória.

Os parâmetros da regressão linear foram estimados pelo MMQO aplicado ao modelo linear $y = a + bx$, onde y é a área do pico cromatográfico, x é a concentração de fumonisina B₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) e, a e b , interseção e inclinação, respectivamente. Foram construídos os gráficos dos resíduos da regressão, os quais indicaram os valores extremos (*outliers*), ou seja, os pontos fora do intervalo $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} s_{res}$, sendo s_{res} o desvio padrão dos resíduos da regressão. Através do teste de resíduos padronizados Jackknife foi possível a confirmação e tratamento dos *outliers*. Verificou-se a normalidade dos resíduos de regressão pelo teste de Ryan-Joiner,

a homoscedasticidade pelo teste de Brown-Forsythe e a independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin-Watson, como também se verificou a significância da regressão linear e do desvio de linearidade (ajuste ao modelo linear), considerando um nível de significância de 5%.

2.2.2.3. Efeito de Matriz

Uma vez comprovada a linearidade das curvas de calibração de fumonisina B₁ em solvente e em extratos de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral pelo procedimento proposto por Souza e Junqueira, 2005, a inclinação e a interseção obtidas para a curva em solvente foram comparadas com a inclinação e interseção das curvas de fumonisina B₁ em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral. A homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas de calibração foi avaliada pelo teste de *F*, para verificar se as inclinações e interseções seriam comparadas pelo teste de *t* com as variâncias combinadas ou distintas (SOUZA, 2007).

2.2.2.4. Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção do método foi definido como a menor concentração de fumonisina B₁ em extrato de arroz que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. E, o limite de quantificação como a menor concentração de fumonisina B₁ em extrato de arroz que pode ser detectada e quantificada com exatidão e precisão (EURACHEM, 1998; RIBANI et al., 2004).

As determinações foram realizadas em triplicata para cada extrato de arroz dos subgrupos polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral e os limites estabelecidos pela avaliação visual dos picos cromatográficos, a partir de sucessivas análises cromatográficas de concentrações decrescentes de padrões de fumonisina B₁ (ICH, 1996; RIBANI et al., 2004).

2.2.2.5. Exatidão

A exatidão foi avaliada pela porcentagem de recuperação do método (THOMPSON et al., 2002). Amostras de arroz dos subgrupos polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral foram contaminadas artificialmente com padrão da micotoxina em três diferentes níveis de concentração: 100, 1000 e 2500 µg.kg⁻¹, 12 horas antes do início das análises. As determinações foram realizadas em triplicata, para cada nível avaliado, totalizando 9 ensaios independentes para cada subgrupo de arroz estudado. A porcentagem de

recuperação do método foi calculada como a razão percentual entre a concentração de fumonisina B₁ determinada e a concentração adicionada, utilizando-se adequada curva de calibração na faixa de 100 a 2500 µg.kg⁻¹, cuja linearidade e efeito de matriz foram comprovados.

2.2.2.6. Precisão

A precisão do método foi avaliada pelos ensaios de repetitividade e precisão intermediária (ICH, 1996; INMETRO, 2011). Amostras de arroz dos subgrupos polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral foram contaminadas artificialmente com padrão de fumonisina B₁ nas concentrações de 100, 1000 e 2500 µg.kg⁻¹, 12 horas antes do início das análises.

Os ensaios de repetitividade foram realizados pelo mesmo analista, em um único laboratório, em curto intervalo de tempo em um mesmo dia, empregando o mesmo cromatógrafo a líquido, sob as mesmas condições cromatográficas. As determinações foram realizadas em triplicata, para cada nível avaliado, totalizando 9 ensaios independentes para cada subgrupo de arroz estudado.

A precisão intermediária foi avaliada empregando um mesmo cromatógrafo a líquido, sob as mesmas condições cromatográficas, em um único laboratório, pelo mesmo analista, porém em três diferentes dias de análise. As determinações foram realizadas em triplicata, para cada nível avaliado, nos três dias de análise, totalizando 27 ensaios independentes para cada subgrupo de arroz estudado.

A repetitividade e a precisão intermediária foram expressas como desvio padrão relativo (DPR).

2.2.2.7. Robustez

Na avaliação da robustez do método analítico, amostras de arroz do subgrupo polido foram contaminadas artificialmente com padrão de fumonisina B₁ na concentração de 2000 µg.kg⁻¹, 12 horas antes do início das análises.

A robustez foi verificada mediante pequenas variações em sete variáveis das etapas de extração e purificação do método, que poderiam interferir na determinação da concentração de fumonisina B₁, como o volume de solução extratora, quantidades de sulfato de sódio anidro, cloreto de sódio e Celite®, como também tempo de agitação e centrifugação (Tabela 1), segundo o teste de Youden (EURACHEM, 1998; THOMPSON et al., 2002; INMETRO, 2007). Foram realizados 8 ensaios com as diferentes combinações das variáveis avaliadas,

todos em triplicata, e então determinada a concentração da micotoxina em cada ensaio (Tabela 2). O valor limite foi calculado como $\sqrt{2} \cdot DP$, onde DP é o desvio padrão das concentrações de fumonisina B₁ determinadas nos 8 ensaios (IHA et al., 2009).

Tabela 1 – Níveis das variáveis avaliadas, das etapas de extração e purificação, nas condições nominal e de variação.

	Variável	Nominal	Variação
Extração	Volume de Solução Extratora	20 mL (A)	18 mL (a)
	Sulfato de Sódio Anidro	2,5 g (B)	2,3 g (b)
	Cloreto de Sódio	0,5 g (C)	0,3 g (c)
	Agitação	1 min. (D)	30 seg. (d)
	Centrifugação	2 min. (E)	1 min. (e)
Purificação	Sulfato de Sódio Anidro	0,3 g (F)	0,2 g (f)
	Celite®	0,1 g (G)	0,08 g (g)

Tabela 2 – Matriz dos ensaios para a avaliação da robustez do método.

Combinação Ensaída							
1	2	3	4	5	6	7	8
A	A	A	A	a	a	a	a
B	B	b	b	B	B	b	b
C	c	C	c	C	c	C	c
D	D	d	d	d	d	D	D
E	e	E	e	e	E	e	E
F	f	f	F	F	f	f	F
G	g	g	G	g	G	G	g

Fonte: INMETRO, 2007

2.3. Descontaminação do Material

Todo material foi tratado com solução de hipoclorito de sódio 5% por pelos menos 12 horas antes de ser descartado, seguido de acetona, e lavagem com água (BRASIL, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seletividade

A seletividade foi o primeiro parâmetro de desempenho do método a ser avaliado, uma vez que, se a seletividade do método não fosse assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estariam seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2011).

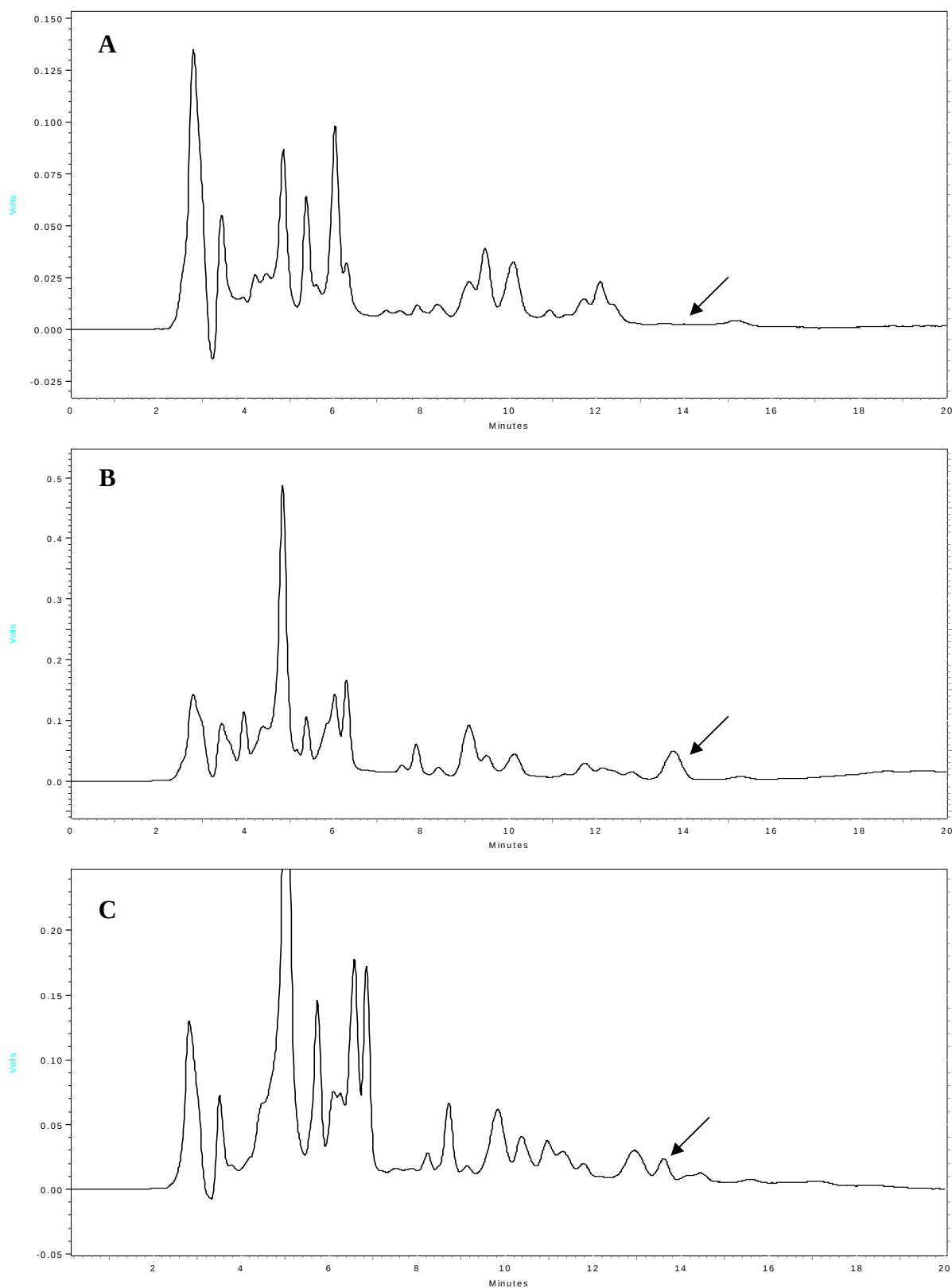
Considerando que as amostras de arroz, dos subgrupos polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, conteriam componentes e impurezas, que poderiam interferir no desempenho do método analítico avaliado, foi imprescindível garantir que o pico cromatográfico de interesse era exclusivamente do derivado fumonisina B₁-OPA.

A seletividade do método analítico foi avaliada pela comparação entre as análises cromatográficas dos extratos de arroz isentos de fumonisina B₁ e as análises cromatográficas dos extratos de arroz adicionados de padrão de fumonisina B₁, como também das amostras de arroz naturalmente contaminadas por fumonisina B₁.

Os cromatogramas apresentados nas Figuras de 1 a 4 indicaram a seletividade do método analítico, confirmando a capacidade do método em separar, detectar e quantificar a micotoxina na presença de outros componentes e impurezas da matriz. Observou-se a separação do derivado fumonisina B₁-OPA, de forma inequívoca, de outros compostos provenientes da reação de derivatização, que poderiam interferir na determinação de fumonisina B₁.

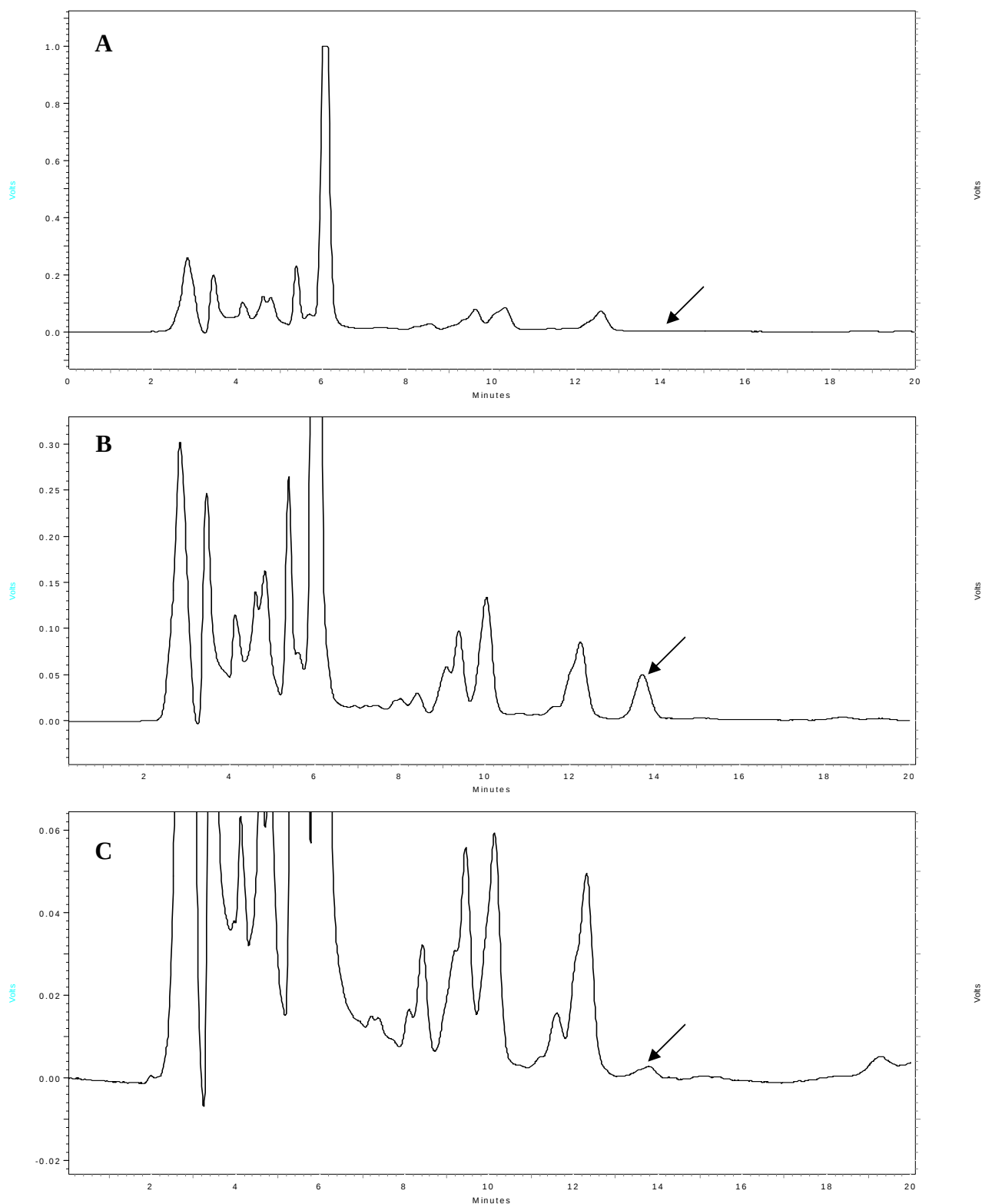
Para os extratos de arroz polido, arroz parboilizado polido, integral e parboilizado integral, adicionados de fumonisina B₁, verificou-se que nenhum interferente eluiu no tempo de retenção do derivado fumonisina B₁-OPA, de $13,5 \pm 0,5$ minutos, como também nas amostras de arroz naturalmente contaminadas por fumonisina B₁, demonstrando a seletividade do método analítico para a micotoxina estudada.

Figura 1 – Cromatogramas característicos de extratos de arroz polido.



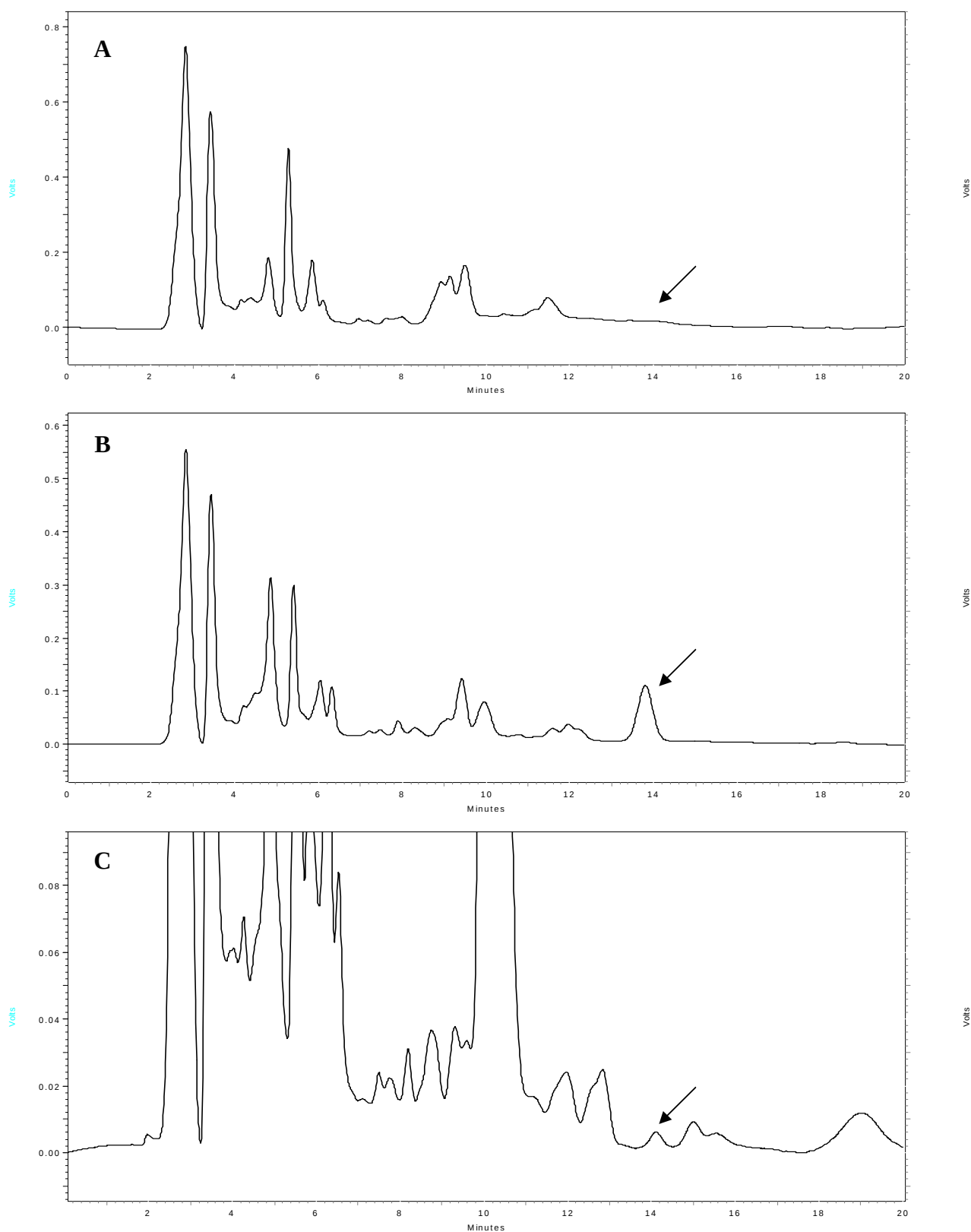
A: extrato de arroz polido livre de FB₁; B: extrato de arroz polido adicionado de padrão de FB₁; C: amostra de arroz polido naturalmente contaminada com FB₁. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 (44:56), vazão: 1,0 mL.min.⁻¹, coluna ODS Hypersil (25 x 4,6 mm, 5 µm) temperatura da coluna: 20°C e volume injetado: 10 µL.

Figura 2 – Cromatogramas característicos de extratos de arroz parboilizado polido.



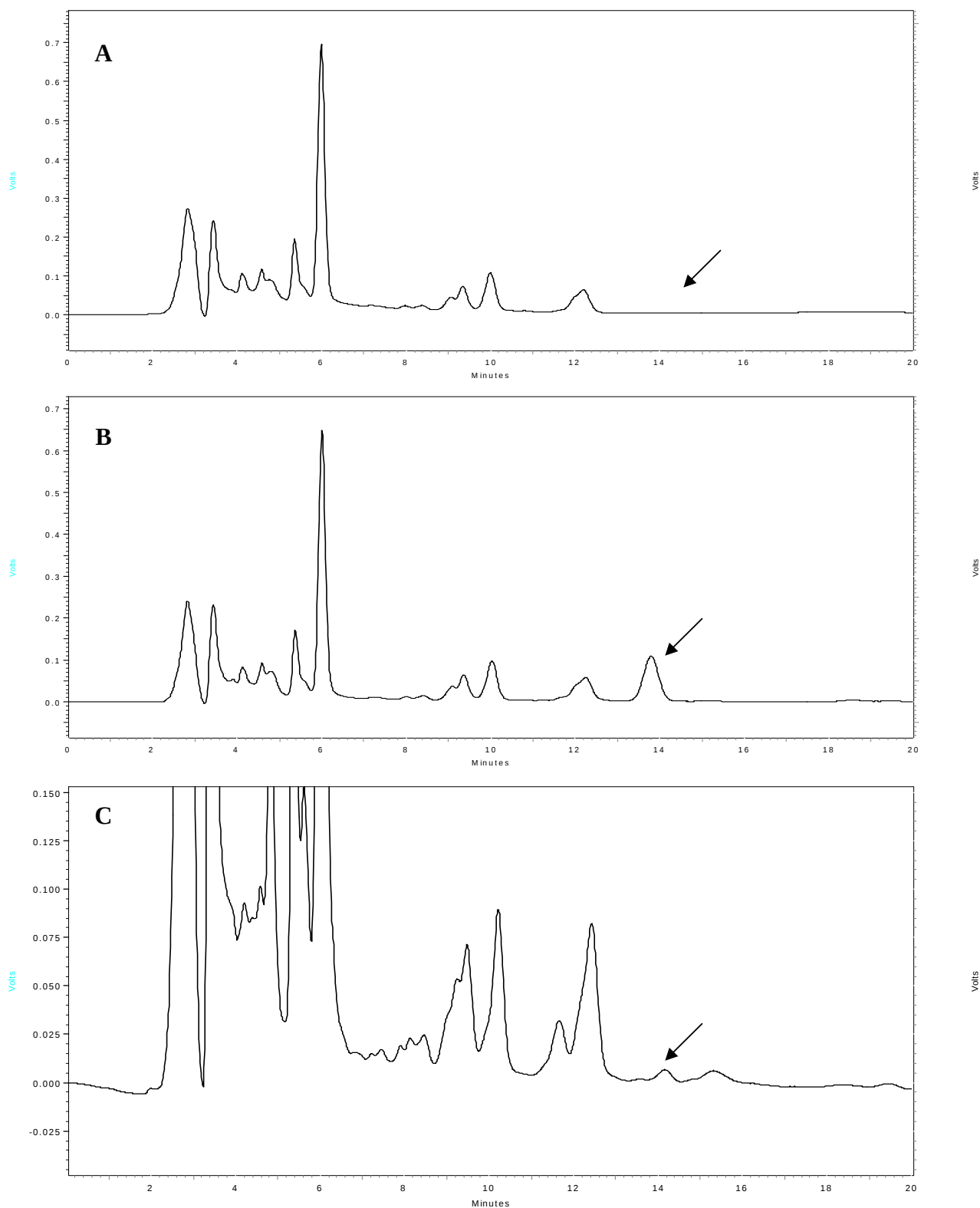
A: extrato de arroz parboilizado polido livre de FB₁; B: extrato de arroz parboilizado polido adicionado de padrão de FB₁; C: amostra de arroz parboilizado polido naturalmente contaminada com FB₁. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 (44:56), vazão: 1,0 mL.min⁻¹, coluna ODS Hypersil (25 x 4,6 mm, 5 µm), temperatura da coluna: 20°C e volume injetado: 10 µL.

Figura 3 – Cromatogramas característicos de extratos de arroz integral.



A: extrato de arroz integral livre de FB₁; B: extrato de arroz integral adicionado de padrão de FB₁; C: amostra de arroz integral naturalmente contaminada com FB₁. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 (44:56), vazão: 1,0 mL.min.⁻¹, coluna ODS Hypersil (25 x 4,6 mm, 5 µm), temperatura da coluna: 20°C e volume injetado: 10 µL.

Figura 4. Cromatogramas característicos de extratos de arroz parboilizado integral.



A: extrato de arroz parboilizado integral livre de FB₁; B: extrato de arroz parboilizado integral adicionado de padrão de FB₁; C: amostra de arroz parboilizado integral naturalmente contaminada com FB₁. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 (44:56), vazão: 1,0 mL.min.⁻¹, coluna ODS Hypersil (25 x 4,6 mm, 5 µm), temperatura da coluna: 20°C e volume injetado: 10 µL.

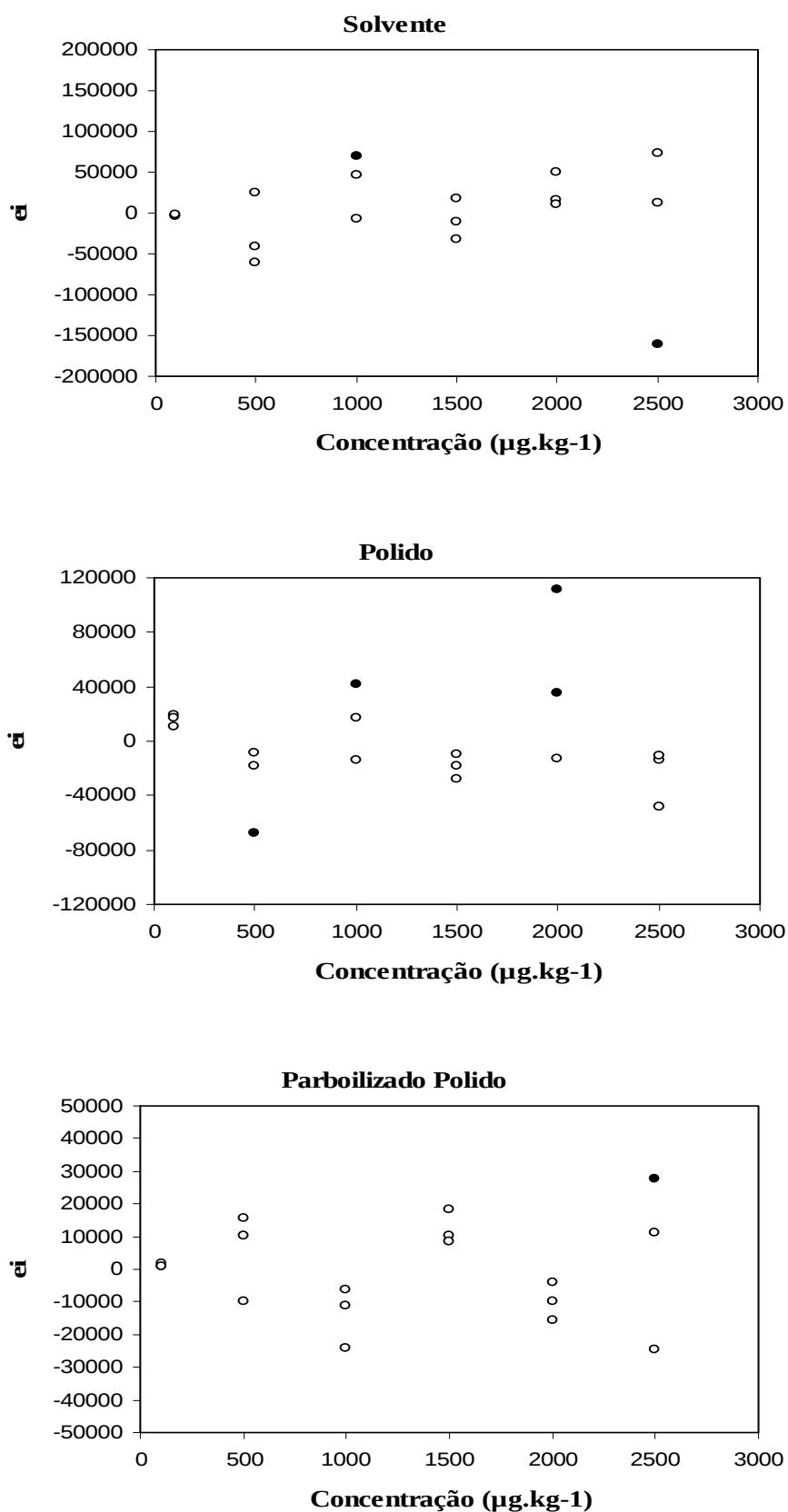
3.2. Linearidade

Primeiramente foram preparadas três curvas de calibração de fumonisina B₁ em solvente (acetonitrila: água, 1:1), e três em extratos de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, em seis níveis de concentração, preparados independentemente, sendo três replicatas de cada nível, com leituras em ordem aleatória. Uma vez que era desconhecido o nível de contaminação por fumonisina B₁ no arroz nacional, empregou-se uma ampla faixa de concentração, de 100 a 2500 µg.kg⁻¹.

A partir das respostas obtidas experimentalmente (área do pico cromatográfico) para as soluções padrão de fumonisina B₁ preparadas, estimaram-se os parâmetros de regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários, inclinação e interseção, os resíduos da regressão e o coeficiente de determinação (R^2). Realizou-se uma inspeção visual do gráfico das respostas (área do pico) *versus* concentração de padrão, e então a construção dos gráficos dos resíduos da regressão *versus* a concentração de fumosina B₁.

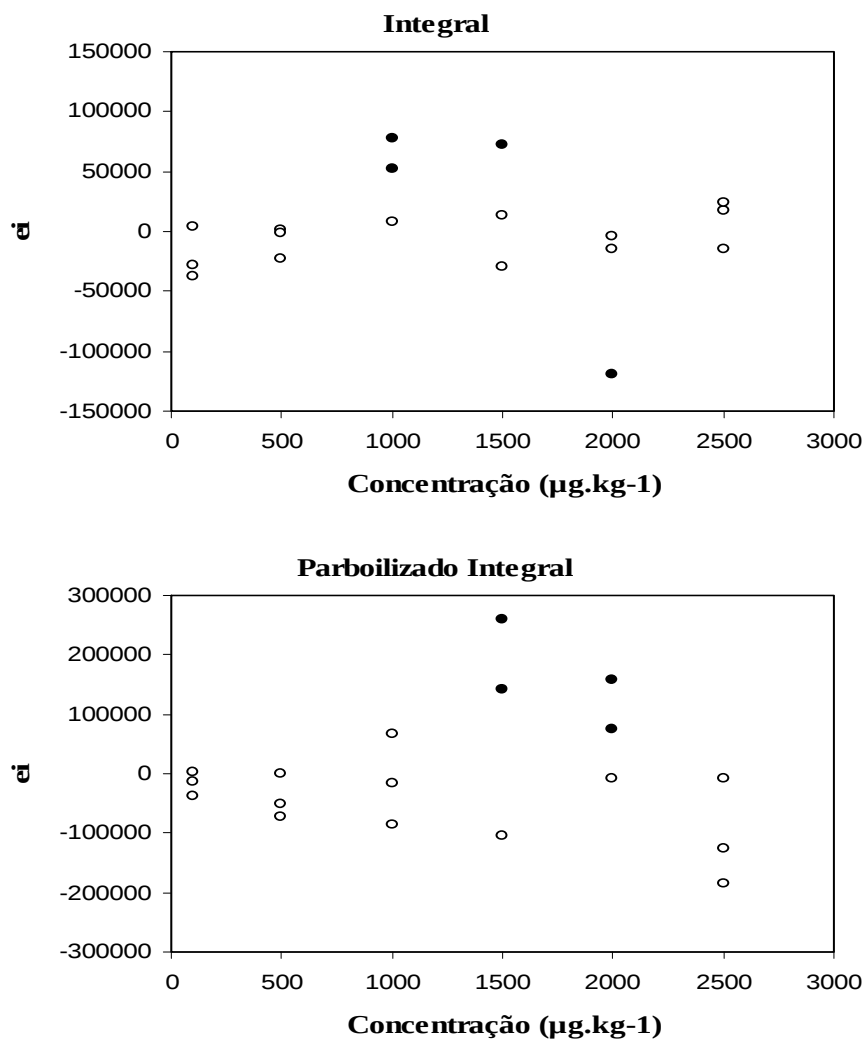
As Figuras 5 e 6 apresentam os gráficos dos resíduos da regressão, com a indicação dos valores extremos (*outliers*), considerando o intervalo de confiança dos resíduos de $\pm t_{(0,975; n-2)} s_{res}$. Os intervalos sugeriram a presença de dois *outliers* na curva em solvente, um no nível 1000 µg.kg⁻¹ e outro no nível 2500 µg.kg⁻¹; quatro *outliers* na curva em extrato de arroz polido, um no nível 500 µg.kg⁻¹, outro em 1000 µg.kg⁻¹ e dois no nível 2000 µg.kg⁻¹; um *outlier* na curva em extrato de arroz parboilizado polido no nível 2500 µg.kg⁻¹; quatro *outliers* na curva em extrato de arroz integral, sendo dois no nível 1000 µg.kg⁻¹, um em 1500 µg.kg⁻¹ e outro em 2000 µg.kg⁻¹; e quatro *outliers* na curva em extrato de arroz parboilizado integral, dois no nível 1500 µg.kg⁻¹ e dois em 2000 µg.kg⁻¹. Os *outliers* foram confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, e então removidos no máximo quatro em cada curva, o que corresponde ao limite de 22,2% do número original de dados (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

Figura 5 – Gráficos dos resíduos de regressão das curvas de fumonisina B₁ (100 – 2500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido e parboilizado polido, com os respectivos *outliers* confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.



e_i : resíduo da regressão; ● : *outlier*.

Figura 6 – Gráficos dos resíduos de regressão das curvas de fumonisina B₁ (100 – 2500 µg.kg⁻¹) em extrato de arroz integral e parboilizado integral, com os respectivos *outliers* confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.



e_i : resíduo da regressão; ● : *outlier*.

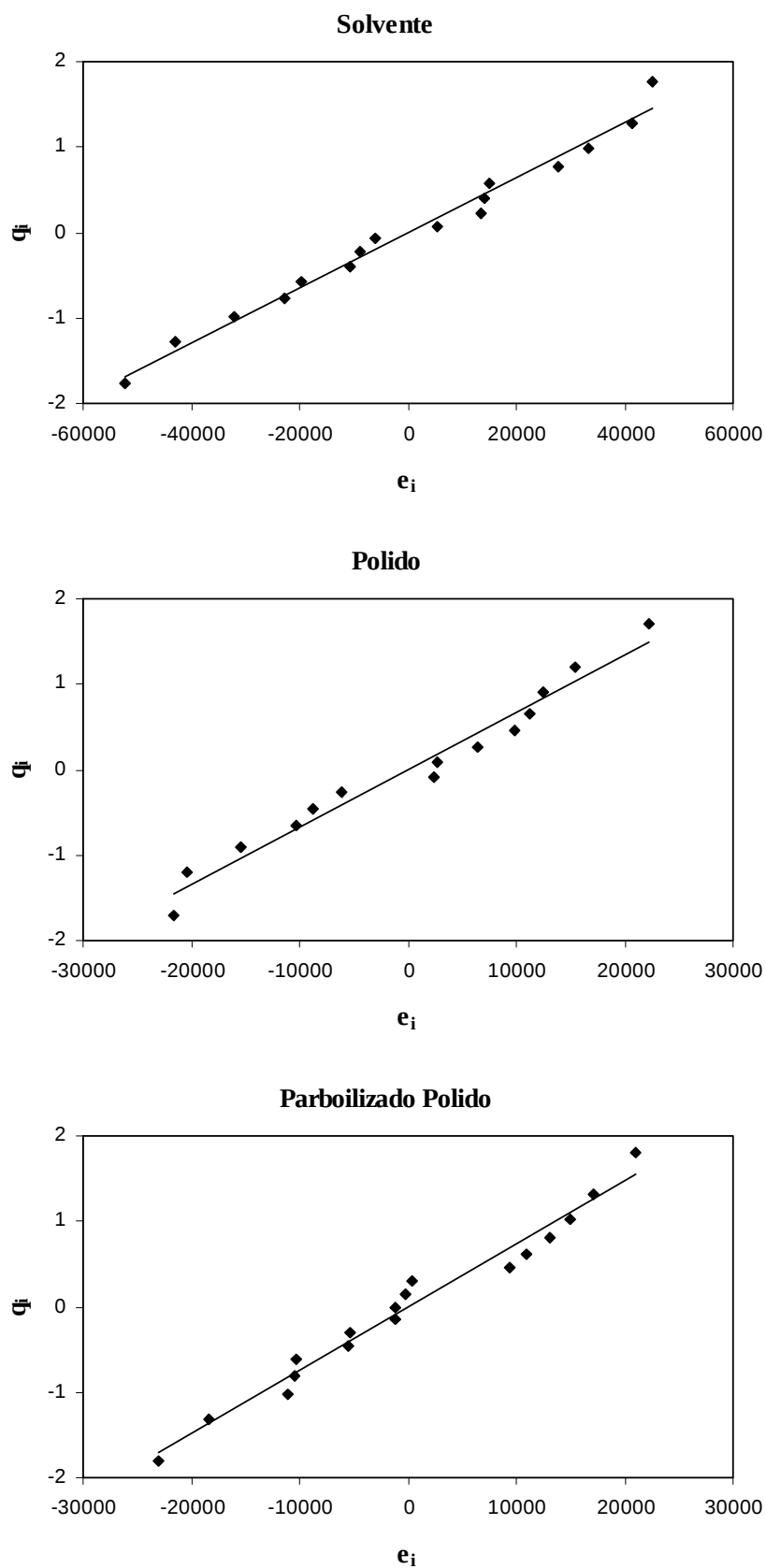
A partir dos resíduos da regressão estimados, excluindo-se aqueles confirmados como *outliers*, verificaram-se as premissas de normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos.

A normalidade dos resíduos de regressão foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner, o qual testa a hipótese nula de que os resíduos seguem a distribuição normal, na qual os desvios da normalidade não são significativos, contra uma hipótese alternativa de que os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade, com os desvios da normalidade significativos (SOUZA, 2007).

Os gráficos de Ryan-Joiner indicaram correlação significativa entre os resíduos da regressão obtidos (e_i) e os valores normais esperados (q_i), em cada curva avaliada. Os coeficientes de correlação obtidos para as curvas de fumonisina B₁ em solvente e em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral foram de 0,9915, 0,9840, 0,9867, 0,9446 e 0,9787, com valores críticos de 0,9411, 0,9351, 0,9437, 0,9351 e 0,9351, respectivamente, o que demonstra que o desvio da normalidade não foi significativo ($p > 0,05$) (Tabela 3), assim, aceita-se a hipótese nula de que os resíduos seguem a distribuição normal.

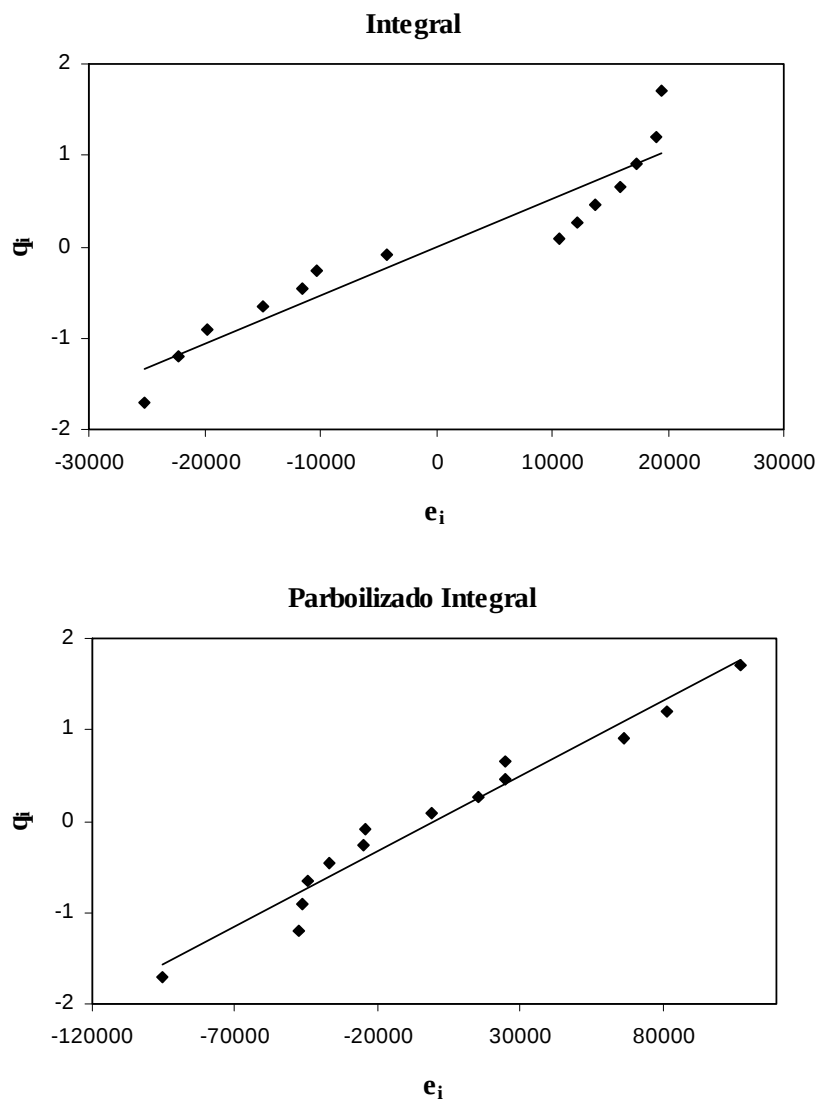
As Figuras 7 e 8 apresentam os gráficos de probabilidade normal das curvas de fumonisina B₁ em solvente e em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral.

Figura 7 – Gráficos de probabilidade normal das curvas de fumonisina B₁ (100 – 2500 µg.kg⁻¹) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido e parboilizado polido.



e_i : resíduo da regressão; q_i : valor normal esperado.

Figura 8 – Gráficos de probabilidade normal das curvas de fumonisina B₁ (100 – 2500 µg.kg⁻¹) em extrato de arroz integral e parboilizado integral.



e_i : resíduo da regressão; q_i : valor normal esperado.

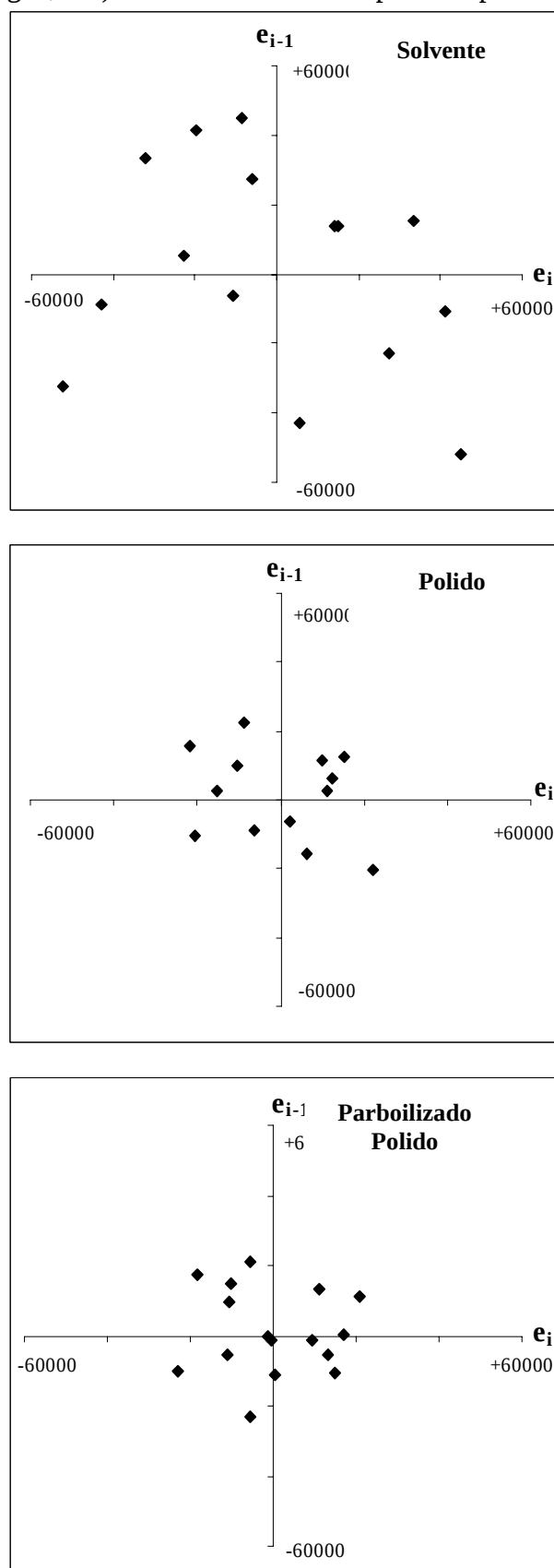
A homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi verificada pelo teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado, o qual testa a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos não diferem entre si (há homoscedasticidade), contra a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos são diferentes (há heteroscedasticidade) (SOUZA, 2007). As estatísticas t de Levene estimadas em 0,271, 0,183, 0,942, 0,398 e 1,04 para as curvas de fumonisina B₁ em solvente e em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, respectivamente, não foram significativas ($p > 0,05$) (Tabela 3), assim, aceita-se a hipótese nula do teste de que as variâncias dos resíduos não diferem entre si, indicando a homoscedasticidade dos resíduos de regressão.

A independência dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson, que confronta a hipótese nula de que não há autocorrelação dos resíduos da regressão (independência dos resíduos) contra a hipótese alternativa de que há autocorrelação dos resíduos da regressão (os resíduos não são independentes) (SOUZA, 2007).

As estatísticas de Durbin-Watson d calculadas foram 2,448, 2,254, 1,962, 2,769 e 2,027 para as curvas de fumonisina B₁ em solvente e em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, respectivamente (Tabela 3), indicando a aceitação da hipótese nula, ou seja, não houve autocorrelação, assume-se que os resíduos da regressão são independentes ($p > 0,05$). Os valores de d variam de 0 a 4, com média de 2, quanto mais próximo de 0 ou 4 aumenta a autocorrelação. Valores iguais a 0 e 4 indicam perfeita autocorrelação positiva e perfeita autocorrelação negativa, respectivamente, no entanto, valores próximos a 2 indicam que não há autocorrelação (SOUZA, 2007). Todos os valores da estatística de Durbin-Watson foram maiores ao limite crítico superior, a um nível de significância de 5%.

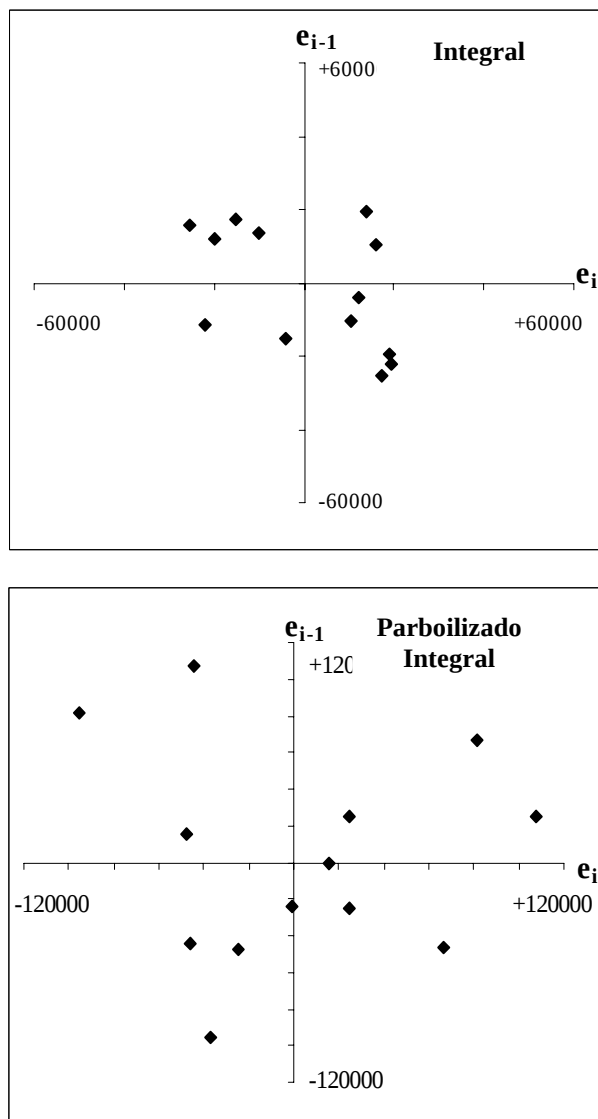
Nas Figuras 9 e 10, é possível verificar a independência dos resíduos da regressão, onde se observa uma distribuição aleatória dos resíduos nos quatro quadrantes dos gráficos de Durbin-Watson.

Figura 9 – Gráficos de Durbin-Watson das curvas de fumonisina B₁ (100 – 2500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido e parboilizado polido.



e_i : resíduo da regressão; e_{i-1} : valor imediatamente anterior.

Figura 10 – Gráficos de Durbin-Watson das curvas de fumonisina B₁ (100 – 2500 µg.kg⁻¹) em extrato de arroz integral e parboilizado integral.



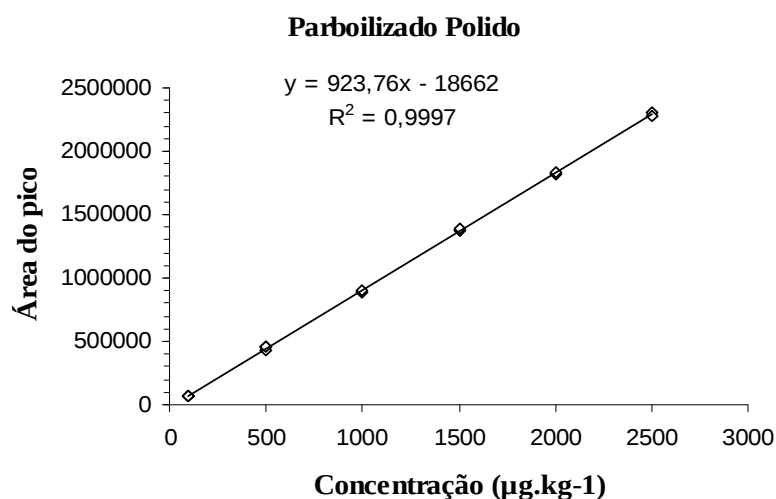
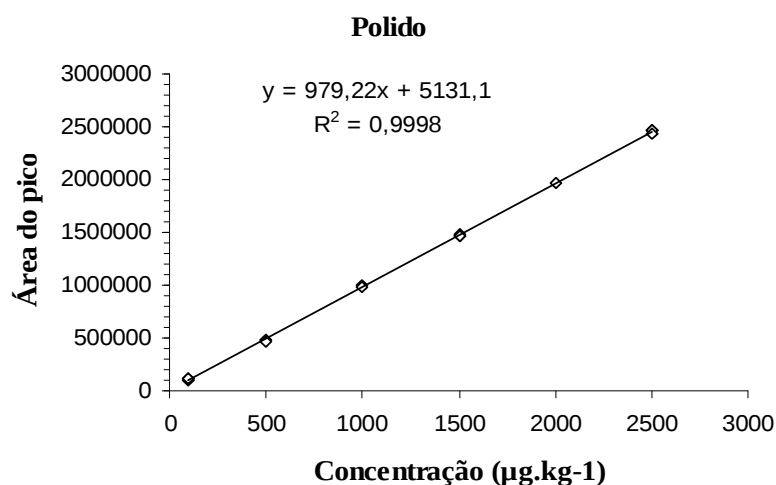
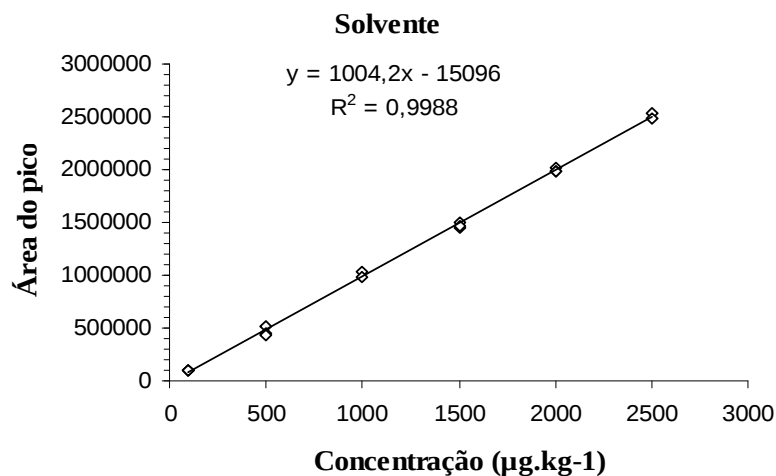
e_i : resíduo da regressão; e_{i-1} : valor imediatamente anterior.

Através da análise de variância, avaliou-se a significância da regressão linear e do desvio da linearidade (ajuste ao modelo linear) das curvas de fumonisina B₁ em solvente e nos quatro extratos de arroz. Na avaliação da significância da regressão linear, testou-se a hipótese nula de que a regressão não é significativa (a variação das respostas medidas não é explicada pela regressão) contra a hipótese alternativa de que a regressão é significativa (a variação das respostas medidas é explicada pela regressão linear) (SOUZA, 2007). A estatística F (razão entre as variâncias) calculada para todas as curvas de calibração foi maior que o valor de $F_{crítico}$ (Tabela 3), assim rejeitou-se a hipótese nula. No entanto, na avaliação da significância do desvio da linearidade, testou-se a hipótese nula de que o modelo linear simples é correto

(não há desvio da linearidade) contra a hipótese alternativa de que o modelo linear simples é inadequado (há desvio da linearidade) (SOUZA, 2007). A estatística F (razão entre as variâncias) calculada para todas as curvas de calibração foi menor que o valor de $F_{crítico}$ (Tabela 3), assim aceitou-se a hipótese nula.

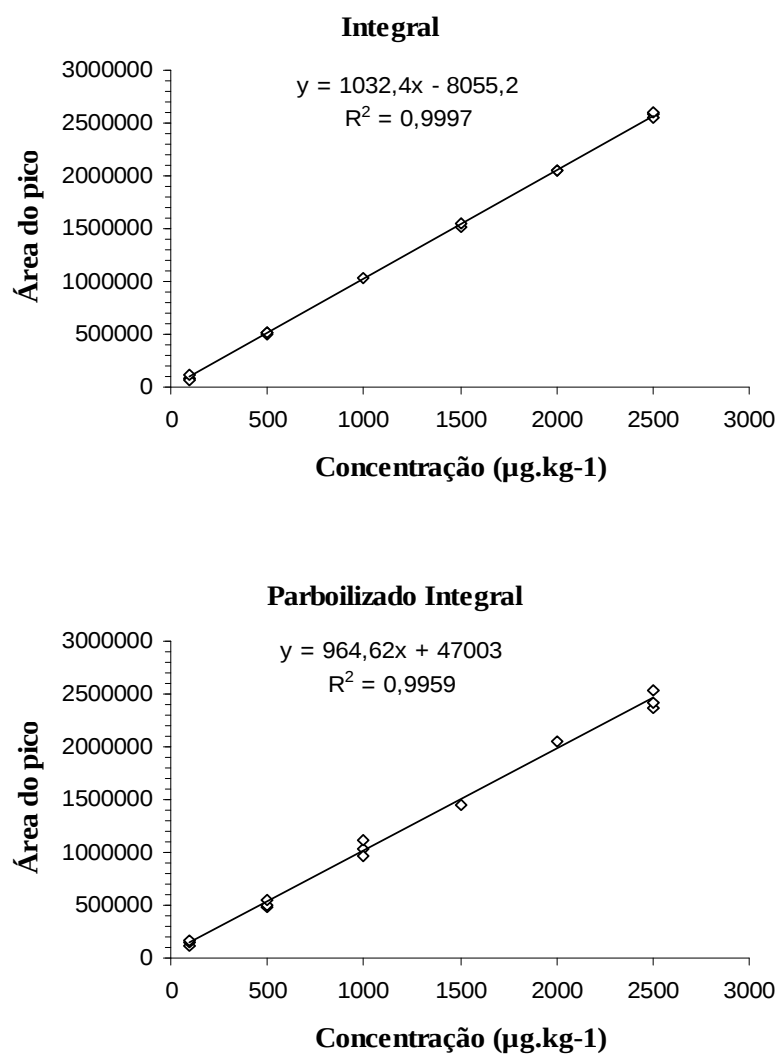
Dessa forma, verificou-se que as curvas de fumonisina B₁ em solvente e nos extratos de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral apresentaram regressão linear altamente significativa ($p < 0,001$) e desvio de linearidade não significativo ($p > 0,05$), demonstrando linearidade na faixa estudada de 100 a 2500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. As Figuras 11 e 12 apresentam as curvas de calibração de fumonisina B₁ em solvente e nos quatro extratos de arroz avaliados, com as respectivas equações da reta de regressão linear e os coeficientes de determinação (R^2).

Figura 11 – Curvas de calibração de fumonisina B₁ (100 – 2500 µg.kg⁻¹) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido e parboilizado polido, com as respectivas equações da reta de regressão linear e coeficientes de determinação (R^2).



y = área do pico; x = concentração de fumonisina B₁ (µg.kg⁻¹).

Figura 12 – Curvas de calibração de fumonisina B₁ (100 – 2500 µg.kg⁻¹) em extrato de arroz integral e parboilizado integral, com as respectivas equações da reta de regressão linear e coeficientes de determinação (R^2).



y = área do pico; x = concentração de fumonisina B₁ (µg.kg⁻¹).

Tabela 3 – Avaliação da linearidade das curvas de calibração de fumonisina B₁ (100 – 2500 µg.kg⁻¹) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral.

Estatística	Solvente	Polido	Parboilizado Polido	Integral	Parboilizado Integral
<i>n</i>	16	14	17	14	14
<i>Normalidade</i>					
<i>R</i>	0,992	0,984	0,987	0,945	0,979
<i>R</i> crítico	0,941	0,935	0,944	0,935	0,935
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<i>Homoscedasticidade</i>					
<i>t_L</i>	0,271	0,183	0,942	0,398	1,040
<i>p</i>	0,790	0,860	0,360	0,700	0,320
<i>Independência</i>					
<i>d</i>	2,448	2,254	1,962	2,769	2,027
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<i>Regressão</i>					
<i>F</i>	11686,610	48721,130	52951,030	39891,770	2897,880
<i>F</i> crítico	4,600	4,747	4,543	4,747	4,747
<i>p</i>	7,36 x 10 ⁻²²	5,03 x 10 ⁻²³	4,98 x 10 ⁻²⁸	1,67 x 10 ⁻²²	1,11 x 10 ⁻¹⁵
<i>Desvio da linearidade</i>					
<i>F</i>	0,968	1,180	2,875	0,420	0,687
<i>F</i> crítico	3,478	3,838	3,357	3,838	3,838
<i>p</i>	4,66 x 10 ⁻¹	3,89 x 10 ⁻¹	7,44 x 10 ⁻²	7,91 x 10 ⁻¹	6,21 x 10 ⁻¹

n: número de observações; *R*: coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; *t_L*: estatística t de Levene, *d*: estatística de Durbin-Watson; *F*: razão entre variâncias; *p*: significância.

3.3. Efeito de Matriz

Uma vez verificadas normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos da regressão, como também regressão linear significativa ($p < 0,001$) e desvio de linearidade não significativo ($p > 0,05$), após a remoção de valores extremos detectados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, avaliou-se o efeito de matriz através da comparação entre as inclinações e interseções da curva de fumonisina B₁ em solvente e das curvas em extratos de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral.

Empregou-se o teste F na avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão, o qual testa a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos não diferem entre si, ou seja, há homoscedasticidade, contra a hipótese alternativa de que as variâncias são diferentes, há heteroscedasticidade (SOUZA, 2007). Verificou-se que as estatísticas F calculadas foram maiores que o valor crítico (Tabela 4), assim rejeitou-se a hipótese nula. Estes resultados indicaram que as variâncias dos resíduos da regressão foram diferentes para todas as curvas de fumonisina B₁ em solvente comparada com as curvas em extratos de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral.

Tabela 4 – Avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão das curvas de fumonisina B₁ (100 – 2500 µg.kg⁻¹) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral.

	Estatística	
	F	$F_{crítico}$
Polido	4,424	2,637
Parboilizado Polido	5,334	2,424
Integral	2,979	2,637
Parboilizado Integral	3,790	2,534

F : razão entre variâncias.

As inclinações e interseções da curva de calibração de fumonisina B₁ em solvente e das curvas em extratos de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral foram comparadas pelo teste de t (Tabela 5). O teste confronta a hipótese nula de que as inclinações ou interseções não diferem entre si contra a hipótese alternativa de que as inclinações ou interseções são diferentes, rejeitando-se a hipótese nula quando a estatística t_a (interseção) ou t_b (inclinação) calculada for maior que o valor crítico (SOUZA, 2007).

Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a inclinação da curva de fumonisina B₁ em solvente e as inclinações das curvas em extrato de arroz polido, parboilizado polido e integral, como também diferença significativa ($p < 0,05$) entre a interseção da curva de fumonisina B₁ em solvente e da curva em extrato de arroz parboilizado integral (Tabela 5). Estes resultados indicaram que a curva de fumonisina B₁ em solvente forneceu respostas significativamente diferentes daquelas obtidas com as curvas em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado

integral, nos mesmos níveis de concentração, evidenciando efeito de matriz, o que indica a necessidade da utilização de curvas de calibração em extrato de arroz para estimar a concentração de fumonisina B₁ em arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral.

Tabela 5 – Comparação entre as interseções e inclinações das curvas de fumonisina B₁ (100 – 2500 µg.kg⁻¹) em solvente (acetonitrila: água, 1:1) e em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral.

Estatística	Polido	Parboilizado Polido	Integral	Parboilizado Integral
<i>Interseção</i>				
t_a	1,338	0,242	0,448	2,138
$t_{crítico}$	2,086	2,101	2,074	2,109
p	0,196	0,811	0,658	0,047
<i>Inclinação</i>				
t_b	2,425	7,947	2,656	1,960
$t_{crítico}$	2,086	2,101	2,074	2,109
p	0,025	0,000	0,014	0,067

t_a : estatística t para contrastes entre interseções; t_b : estatística t para contrastes entre inclinações; p : significância.

3.4. Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) do método foi definido como a menor concentração de fumonisina B₁ que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. A partir das análises cromatográficas de padrões, em concentrações decrescentes, em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, isentos de fumonisina B₁, estabeleceu-se o LD de 50 µg.kg⁻¹, sendo a menor concentração que permitiu a visualização inequívoca do pico cromatográfico de interesse. O mesmo limite de detecção foi o definido para o método da AOAC–IUPAC, para a determinação de fumonisina B₁ em milho (SYDENHAM et al., 1996), como também foi o reportado por Shephard (1998) e Arranz et al. (2004), como sendo o limite normalmente estabelecido quando se emprega *orto*-ftaldialdeído como reagente derivatizante.

Entretanto, limites de detecção entre 35 e 36 µg.kg⁻¹ (SCOTT et al., 1999; PARK et al., 2005), e de 25 µg.kg⁻¹ (SEO et al., 2009) foram reportados em estudos

sobre a ocorrência de fumonisina B₁ em arroz, nos quais empregaram-se o reagente derivatizante OPA, e na etapa de purificação cartuchos de extração em fase sólida do tipo troca aniônica forte (SAX) e colunas de imunoafinidade, respectivamente.

O limite de quantificação (LQ) do método foi definido como a menor concentração de fumonisina B₁ que pode ser detectada e quantificada com exatidão e precisão. A partir das análises cromatográficas de padrões em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, isentos de fumonisina B₁, estabeleceu-se o LQ de 100 µg.kg⁻¹, sendo a menor concentração da faixa linear das curvas de calibração avaliadas, a qual permitiu a quantificação de fumonisina B₁ com exatidão e precisão.

3.5. Exatidão e Precisão

A exatidão do método foi avaliada empregando os ensaios de recuperação. Amostras de arroz livres de fumonisina B₁ foram adicionadas do padrão da micotoxina em três diferentes níveis de concentração – no limite de quantificação do método, próximo à média da faixa de uso do método, e na concentração máxima avaliada na linearidade.

A contaminação das amostras de arroz foi realizada 12 horas antes do início das análises, com a finalidade de promover maior interação entre a micotoxina e a matriz. Uma limitação dos ensaios de recuperação é a do padrão adicionado na matriz não estar necessariamente na mesma forma que a micotoxina presente naturalmente na amostra, o que pode resultar em uma melhor detecção e avaliações otimistas da recuperação do método (INMETRO, 2011), no entanto, os ensaios de recuperação permitem que o analito de interesse seja avaliado na presença de possíveis interferentes, como impurezas e outros componentes da matriz.

Para o arroz polido, as porcentagens de recuperação do método variaram de 94,02 a 108,01 %, com recuperação média de 100,48%. Enquanto, para o arroz parboilizado polido, as porcentagens variaram entre 96,29 e 112,10%, com recuperação média de 104,97% (Tabela 6).

As porcentagens de recuperação do método, para o arroz integral, variaram entre 71,73 e 109,65 %, com média de 87,60%. Já para o arroz parboilizado integral, as porcentagens foram de 81,78 a 104,69 %, com recuperação média de 91,76% (Tabela 7). Observou-se que o arroz integral foi o que apresentou a menor porcentagem média

de recuperação, demonstrando que o subgrupo do arroz pode interferir na determinação da micotoxina.

Nos quatro subgrupos de arroz avaliados, verificaram-se as maiores porcentagens de recuperações nos menores níveis de micotoxina estudados, entretanto, todas as porcentagens de recuperação obtidas foram satisfatórias, uma vez que, se aceita porcentagens de recuperação entre 60 e 120% para concentrações de fumonisina B₁ menor ou igual a 500 µg.kg⁻¹, e de 70 a 110% para concentrações maiores que 500 µg.kg⁻¹ (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2005; BRASIL, 2009).

Scott et al., (1999) reportaram porcentagens de recuperação de fumonisina B₁ em arroz em casca, arroz marrom e arroz preto, de 46, 98,6 e 107%, respectivamente, empregando cartuchos de extração em fase sólida do tipo troca aniônica forte (SAX) na etapa de purificação.

A precisão do método analítico foi avaliada mediante ensaios de repetitividade e de precisão intermediária, expressos como desvio padrão relativo.

Os ensaios de repetitividade foram realizados com a finalidade de demonstrar a concordância entre os resultados obtidos de sucessivas determinações de fumonisina B₁ independentes, empregando o método analítico avaliado. Todas as determinações foram realizadas em um mesmo cromatógrafo a líquido, sob as mesmas condições cromatográficas, em um mesmo laboratório, em um curto intervalo de tempo entre as análises, num mesmo dia, e pelo mesmo analista.

Os desvios padrão relativos, sob as condições de repetitividade, variaram de 2,78 a 7,59%, de 2,95 a 8,31%, de 2,90 a 4,33%, e de 0,85 a 5,38%, para o arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, respectivamente (Tabelas 6 e 7). Os resultados foram satisfatórios, considerando-se os critérios de desempenho de métodos analíticos aceitos no Brasil (BRASIL, 2009) e pela Comunidade Européia (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2005), sendo de ≤ 30%, em concentrações inferior ou igual a 500 µg.kg⁻¹ de fumonisina B₁, e de ≤ 20%, em concentrações superiores a 500 µg.kg⁻¹ de fumonisina B₁. Observaram-se valores de desvios padrão relativos consideravelmente baixos, demonstrando o quanto os resultados obtidos foram concordantes, para uma mesma amostra de arroz.

A precisão intermediária foi avaliada com o propósito de verificar a capacidade do método analítico estudado de fornecer os mesmos resultados da concentração de fumonisina B₁, em diferentes dias de análises, em um mesmo laboratório. Ensaios de

repetitividade empregando o mesmo cromatógrafo a líquido, sob as mesmas condições cromatográficas, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, foram realizados em três diferentes dias.

Os desvios padrão relativos, sob condições de precisão intermediária, variaram de 5,60 a 13,71%, de 2,07 a 4,90%, de 4,83 a 17,01%, e de 8,75 a 16,68%, para o arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, respectivamente (Tabelas 6 e 7). Observaram-se, sob as condições de precisão intermediária, valores de desvio padrão relativo maiores, em relação aos valores obtidos sob as condições de repetitividade. Entretanto, todos esses valores apresentaram-se dentro dos critérios de desempenho aceitos no Brasil e pela Comunidade Européia, apresentados anteriormente.

De acordo com o INMETRO, 2007, na avaliação da precisão de um método, a precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um mesmo laboratório, desta forma é sempre aconselhável utilizá-la.

Tabela 6 – Porcentagens de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e de precisão intermediária, em amostras de arroz polido e parboilizado polido.

Concentração ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Polido			Parboilizado Polido		
	R (%)	DPR_r (%)	DPR (%)	R (%)	DPR_r (%)	DPR (%)
100	108,01	2,78	5,60	112,10	5,50	4,90
1000	99,41	7,59	12,86	106,54	2,95	2,07
2500	94,02	5,10	13,71	96,29	8,31	2,66

R: recuperação média; DPR_r: desvio padrão relativo sob condições de repetitividade; DPR: desvio padrão relativo sob condições de precisão intermediária.

Tabela 7 – Porcentagens de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e de precisão intermediária, em amostras de arroz integral e parboilizado integral.

Concentração ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Integral			Parboilizado Integral		
	R (%)	DPR _r (%)	DPR (%)	R (%)	DPR _r (%)	DPR (%)
100	109,65	2,90	4,83	104,69	0,85	16,68
1000	81,43	4,33	17,01	88,82	5,38	12,55
2500	71,73	3,17	6,71	81,78	2,39	8,75

R: recuperação média; DPR_r: desvio padrão relativo sob condições de repetitividade; DPR: desvio padrão relativo sob condições de precisão intermediária.

3.6. Robustez

A robustez foi avaliada por meio de pequenas variações em alguns parâmetros do método analítico estudado.

Os parâmetros da etapa de extração – volume de solução extratora, quantidades de sulfato de sódio anidro e de cloreto de sódio, e o tempo de agitação e centrifugação; e da etapa de purificação – quantidades de sulfato de sódio anidro e de Celite® foram identificados como potenciais fatores que possivelmente afetariam a determinação de fumonisina B₁, dessa forma, foram avaliados mediante ponderas modificações em seus níveis.

Verificou-se, na etapa de extração, que a variação em cada parâmetro resultou em diferenças na concentração de fumonisina B₁ entre 12,42 e 91,76 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, em relação à concentração determinada na condição nominal (Tabela 8). A variação de 0,2 g na quantidade de cloreto de sódio adicionada resultou na maior diferença na concentração de fumonisina B₁, enquanto, a redução em 50% no tempo de agitação resultou na menor diferença na concentração de fumonisina B₁.

Na etapa de purificação as variações na quantidade de sulfato de sódio anidro e de Celite® resultaram em pequenas diferenças entre a concentração de fumonisina B₁ determinada na condição nominal e na condição de variação.

As concentrações de fumonisina B₁ determinadas na condição nominal não diferiram significativamente ($p < 0,05$) das obtidas na condição de variação, para cada parâmetro avaliado (Tabela 8).

A partir das concentrações de fumonisina B₁ determinadas em cada ensaio do teste de robustez, calculou-se o valor limite de 93,52. Os valores das diferenças apresentadas entre a concentração de fumonisina B₁ determinada na condição nominal e

na condição de variação foram todos inferiores ao valor limite, indicando que a variação estudada em cada parâmetro não influenciou na determinação de fumonisina B₁, o que demonstra que o método avaliado é robusto, pois os resultados obtidos não foram afetados pelas modificações em suas condições.

Tabela 8 – Condições e resultados da avaliação da robustez do método analítico.

Parâmetros	Condição		Fumonisina B ₁ (µg.kg ⁻¹)*		
	Nominal	Variação	Nominal	Variação	Diferença
<i>Extração</i>					
Volume de Solução Extratora	20 mL	18 mL	1948,45 ^a	1899,83 ^a	48,62
Sulfato de Sódio anidro	2,5 g	2,3 g	1938,91 ^a	1909,37 ^a	29,54
Cloreto de Sódio	0,5 g	0,3 g	1970,02 ^a	1878,26 ^a	91,76
Agitação	1 min.	30 seg.	1930,35 ^a	1917,93 ^a	12,42
Centrifugação	2 min.	1 min.	1951,56 ^a	1896,72 ^a	54,84
<i>Purificação</i>					
Sulfato de Sódio anidro	0,3 g	0,2 g	1933,64 ^a	1914,64 ^a	19,00
Celite®	0,1 g	0,08 g	1929,75 ^a	1918,53 ^a	11,22

*Média (n = 3). Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

4. CONCLUSÃO

Os parâmetros de desempenho do método analítico avaliado indicaram seletividade para a micotoxina fumonisina B₁, linearidade, efeito de matriz significativo, exatidão e precisão do método, baixo limite de detecção e limite de quantificação apropriado para a determinação de fumonisina B₁ em amostras de arroz dos subgrupos polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral.

5. REFERÊNCIAS

A FOCUS FOR ANALYTICAL CHEMISTRY IN EUROPE – EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods.** A laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998. 61 p.

ARRANZ, I.; BAEYENS, W.R.G.; VAN DER WEKEN, G. Review: HPLC determination of fumonisin mycotoxins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 195-203, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005. 31 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18th ed. Gaithersburg: AOAC, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 100, de 21 de Dezembro de 2009. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 22 dez. 2009. Seção 1, p. 90. Disponível em: <http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=90&data=22/12/2009>. Acesso em: 4 fev. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília, 2005. p. 758.

IHA, M.H.; SOUZA, S.V.C.; SABINO, M. Single-laboratory validation of a liquid chromatography method for the determination of patulin in apple juice. **Food Control**, v. 20, p. 569-574, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, 2011. 19 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, 2007. 24 p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN

USE – ICH. **Validation of analytical procedures: methodology**. Geneva: ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1996. 8 p.

PARK, J.W.; CHOI, S.Y.; HWANG, H.J.; KIM, Y.B. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 305-314, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A., LOMBAERT, G.A. Studies on extraction of fumonisins from rice, corn-based foods and beans. **Mycotoxin Research**, v. 15, p. 50-60, 1999.

SEO, E.; YOON, Y.; KIM, K.; SHIM, W.B.; KUZMINA, N.; OH, K.S.O.; LEE, J.O.; KIM, D.S.; SUH, J.; LEE, S.H.; CHUNG, K.H.; CHUNG D.H. Fumonisins B₁ e B₂ in agricultural products consumed in South Korea: an exposure assessment. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 436-440, 2009.

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

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

SOUZA, S.V.C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos**. 2007. 296f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P.W.; VAN SCHALKWYK, D.J. Liquid chromatographic determination of

fumonisin B₁, B₂ and B₃ in corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 3, p. 688-696, 1996.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Directive 2005/38/EC of 6 June 2005. Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels of *Fusarium* toxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 7 Jun. 2005. L 143/18.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

CAPÍTULO V – OCORRÊNCIA DE FUMONISINA B₁ EM ARROZ COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE ARARAQUARA, SP.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a ocorrência de fumonisina B₁ em amostras de arroz. Um total de 51 amostras de arroz do tipo 1, classe longo fino, grupo beneficiado, dos subgrupos polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, foi adquirido no município de Araraquara, SP. A micotoxina foi extraída com solução de acetonitrila 50% acidificada, sob agitação em vórtex, na presença dos sais sulfato de sódio anidro e cloreto de sódio, e na etapa de purificação empregou-se Celite® e sulfato de sódio anidro. A reação de derivatização pré-coluna da fumonisina B₁ foi com o reagente *orto*-ftaldialdeído (OPA). Na separação, detecção e quantificação, empregou-se cromatógrafo a líquido com detector de fluorescência em comprimentos de onda de 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão), fase móvel acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 (44:56) em eluição isocrática e vazão de 1 mL.min⁻¹, e coluna cromatográfica ODS Hypersil (250 x 4,6 mm; 5 µm). Verificou-se contaminação por fumonisina B₁ em aproximadamente 12% do total de 51 amostras analisadas. Das amostras de arroz polido, apenas uma apresentou contaminação por fumonisina B₁, com nível de 258,69 µg.kg⁻¹. Verificou-se que das 10 amostras de arroz parboilizado polido analisadas, duas apresentaram contaminação por fumonisina B₁, com níveis entre 109,36 e 162,99 µg.kg⁻¹, o que representou uma contaminação por fumonisina B₁ em 20% das amostras de arroz parboilizado polido analisadas. Detectou-se a presença de fumonisina B₁ em apenas uma amostra de arroz integral, cujo nível quantificado foi de 111,24 µg.kg⁻¹. Em apenas uma amostra de arroz parboilizado integral foi quantificada a fumonisina B₁, cuja contaminação foi de 110,63 µg.kg⁻¹. Os resultados indicaram uma baixa contaminação do arroz por fumonisina B₁, e a necessidade de mais estudos sobre a ocorrência de fumonisina B₁ em arroz, a fim de corroborarem sobre a incidência da micotoxina no arroz brasileiro.

Palavras-chave: Arroz, Fumonisina B₁, CLAE, Detecção de Fluorescência.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the occurrence of fumonisin B₁ in rice samples. A total of 51 rice samples, 1 type, long thin class, benefited group and polished, polished parboiled, whole and whole parboiled subgroups was purchased in the Araraquara, SP. The mycotoxin was extracted with 50% acidified acetonitrile solution, stirred on vortex, in the presence of the salts anhydrous sodium sulphate and sodium chloride, and in the cleanup step employed Celite® and anhydrous sodium sulphate. The pre-column derivatization reaction of the fumonisin B₁ was with ortho-phthaldialdehyde reagent (OPA). In the separation, detection and quantification was used a liquid chromatograph coupled with fluorescence detection at wavelengths of 335nm (excitation) and 440 nm (emission), mobile phase acetonitrile: 0.1 M sodium phosphate buffer solution adjusted to pH 3.3 with phosphoric acid (44:56), isocratic elution and 1 mL.min⁻¹ flow rate, and a chromatographic column ODS (250 x 4.6 mm, 5µm). The contamination by fumonisin B₁ was observed in approximately 12% of 51 samples analyzed. Contamination by fumonisin B₁ was observed in approximately 12% of 51 samples analyzed. Only one polished rice sample showed contamination by fumonisin B₁ whose level was of 258.69µg.kg⁻¹. Among the total of polished parboiled rice samples analyzed, two samples were contaminated by fumonisin B₁, with levels between 109.36 and 162.99µg.kg⁻¹, indicating a contamination by fumonisin B₁ in 20% of polished parboiled rice samples analyzed. The fumonisin B₁ was detected in one whole rice sample, whose level was 111.24µg.kg⁻¹. Only in a sample of whole parboiled rice was quantified fumonisin B₁, whose level was of 110.63µg.kg⁻¹. The results indicated a low contamination of rice by fumonisin B₁, and the necessity of more studies on the occurrence of the fumonisin B₁ in the rice to confirm the incidence of mycotoxin in Brazilian rice.

Keywords: Rice; Fumonisin B₁; HPLC; Fluorescence Detection.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos poucos países não asiáticos no qual o arroz é cultivado e utilizado como gênero básico do consumo alimentar, estando entre os dez maiores produtores mundiais do cereal. A produção de arroz concentra-se na região Sul do país, que é a responsável por 75% da produção nacional, sendo o Estado do Rio Grande do Sul o maior produtor de arroz do Brasil, onde o cultivo é feito principalmente sob a forma irrigada (BRASIL, 2011a; FAO, 2011).

As práticas ineficientes de pós-colheita somadas às condições tropicais de temperatura e umidade do país, e o fato do arroz ser rico em carboidratos, propiciam o desenvolvimento fúngico, durante a secagem e armazenamento dos grãos, podendo levar à deterioração e perda na qualidade nutricional dos grãos, como também a contaminação por micotoxinas (COELHO et al., 1999; ANDRADE et al., 2003; MAGAN e ALDRED, 2007).

Em estudo sobre a contaminação fúngica de amostras de arroz do Estado do Maranhão, Almeida et al. (2008) relataram que das 216 amostras analisadas, 178 apresentaram contaminação fúngica por *Fusarium*, sendo a espécie *F. verticillioides* a de maior ocorrência. Em outro estudo, também com amostras do Estado do Maranhão, Marassi et al. (2008) revelaram a contaminação do arroz por *Fusarium*. Em estudo conduzido no Rio Grande do Sul, reportou-se a contaminação fúngica por *Fusarium* durante a secagem estacionária e o armazenamento do arroz em casca em silo-secador (HOELTZ et al., 2008), o que sugerem a possibilidade da ocorrência de fumonisina B₁ no cereal.

Fusarium verticillioides é a principal espécie fúngica produtora das fumonisinas, ocorrendo comumente em culturas de milho, trigo, arroz e aveia (BACON e NELSON, 1994). Outras espécies do gênero *Fusarium* também são produtoras de fumonisinas, como *Fusarium proliferatum* (ROSS et al., 1990), *Fusarium nygamai* (THIEL et al., 1992), *Fusarium anthophilum*, *Fusarium dlamini* e *Fusarium napiforme* (NELSON, 1992), *Fusarium subglutinans* (SCOTT, 1993), *Fusarium polyphialidicum* (ABBAS e OCAMB, 1995), e *Fusarium oxysporum* (SEO e LEE, 1999).

Estudos sobre a contaminação do arroz nacional por micotoxinas têm reportado a ocorrência de aflatoxinas B₁, B₂ e G₁ (SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; FURLONG et al., 1999; SIMIONATO, ASTRAY e SYLOS, 2003; SANTOS et al., 2008; SILVA et al., 2008; DORS, PINTO e BADIALE-FURLONG, 2009; DORS, BIERHALS e BADIALE-FURLONG, 2011), citreoviridina (SANTOS et al., 2008;

ROSA et al., 2010), deoxinivalenol (NUNES et al., 2003; DORS, BIERHALS e BADIALE-FURLONG, 2011), ocratoxina A (COELHO, FURLONG e ALMEIDA, 1999; FURLONG et al., 1999; DILKIN et al., 2003; NUNES et al., 2003; SANTOS et al., 2008; DORS, BIERHALS e BADIALE-FURLONG, 2011) e zearalenona (NUNES et al., 2003; SANTOS et al., 2008; DORS, BIERHALS e BADIALE-FURLONG, 2011), em amostras de arroz coletadas nos Estados do Maranhão, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo.

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou a fumonisina B₁ como pertencente ao grupo 2B, ou seja, possivelmente carcinogênica aos seres humanos (IARC, 2011). Nos animais as fumonisinas são responsáveis por leucoencefalomalácia (LEME) em eqüinos (MARASAS et al., 1988), edema pulmonar, hidrotórax e hipertrofia medial das artérias pulmomares em suínos (HARRINSON et al., 1990; CASTEEL et al., 1994), nefrotoxicidade e câncer hepático em ratos (GELDERBLOM et al., 1991), hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI, HANSEN e LABORDE, 1996), aterosclerose em macacos (NORRED, 1993), além da redução do desenvolvimento, problemas cardíacos, imunossupressão, degeneração e necrose hepática em aves (NORRED e VOSS, 1994).

No Brasil, em 2011, foi aprovada a Resolução nº 7 de 18 de Fevereiro, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Os limites máximos permitidos para as fumonisinas B₁ e B₂ variam entre 200 e 2000 µg.kg⁻¹, para alimentos a base de milho destinados à alimentação infantil e milho de pipoca, respectivamente (BRASIL, 2011b).

Frente à toxicidade destes metabólitos fúngicos, verificou-se um grande número de trabalhos sobre a avaliação da ocorrência de fumonisina B₁ principalmente em milho e seus derivados, no entanto, são poucos os estudos sobre a ocorrência de fumonisina B₁ no arroz. Já no Brasil, não há relatos de estudos sobre a pesquisa da ocorrência da micotoxina no arroz nacional.

O objetivo do estudo foi avaliar a ocorrência da micotoxina fumonisina B₁ em amostras de arroz dos subgrupos polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, adquiridas no comércio do município de Araraquara, SP, no ano de 2011, empregando um método analítico rápido, simples e barato, para a extração e purificação, e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência e derivatização pré-coluna.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Arroz

Um total de 51 unidades, de 1 kg cada, de arroz, cujo rótulo declarava tipo 1, classe longo fino, grupo beneficiado, foi adquirido em 5 supermercados e 2 casas cerealistas do município de Araraquara, SP, entre os meses de Agosto e Outubro de 2011. Foram coletadas 20, 10, 6 e 15 unidades dos subgrupos polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, respectivamente, de diferentes marcas e todas dentro do prazo de validade (Figura 1).

Figura 1 – Subgrupos de arroz adquiridos no município de Araraquara, SP.



A: polido, B: parboilizado polido, C: integral e D: parboilizado integral.

2.1.2. Padrão e Reagentes

O padrão de fumonisina B₁ (98% de pureza) e o reagente de derivatização *orto*-ftaldialdeído (OPA) foram adquiridos da *Sigma-Aldrich, Inc.* (St. Louis, MO, USA). Acetonitrila, ácido acético glacial e metanol, todos grau CLAE, foram adquiridos da *J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc.* (Phillipsburg, NJ, USA). Ácido fosfórico e tetraborato de sódio foram adquiridos da *LabSynth* (Diadema, SP, Brasil), fosfato monossódico 1-hidrato e cloreto de sódio da *Merck S.A.* (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 2-mercaptoetanol da *Vetec* (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Sulfato de sódio anidro da *Qhemis* (Indaiatuba, SP, Brasil) e Celite[®] (Hyflo SuperCel) da *Almeria S.A.* (Guadalajara, México). A água utilizada nas análises cromatográficas foi obtida através de sistema de ultra-purificação *Millipore MilliQ system* (Millipore, Milford, MA, USA).

2.1.3. Solução Padrão de Fumonisia B₁

O padrão de fumonisina B₁ (5 mg) foi dissolvido em 5 mL de solução de acetonitrila:água (1:1) obtendo uma solução estoque de 1000 µg.mL⁻¹, de acordo com a AOAC (2005). A partir desta solução, preparou-se solução trabalho de 20 µg.mL⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar, envoltos em alumínio, e estocadas a -18°C.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo da Amostra

As amostras de arroz foram homogeneizadas em sua totalidade e realizado o quarteamento. A quantidade de 1 kg de cada amostra foi colocada no centro de uma superfície limpa e plana, espalhando-a por toda a superfície, e então dividida em quatro partes iguais. Dois quartos, de lados opostos da amostra, foram coletados e combinados, totalizando aproximadamente 500 g de cereal, e os outros dois quartos foram desprezados (MIRANDA, ZENEBON e PENTEADO, 2007).

O cereal foi triturado em multi processador (Arno[®], SP, Brasil) até obtenção de amostra homogênea, passado por peneira de 20 *mesh* e acondicionado em potes plásticos, em temperatura ambiente, até o momento das análises, as quais foram realizadas no mesmo dia da trituração do cereal.

2.2.2. Teor de Umidade

O teor de umidade das amostras de arroz foi determinado por gravimetria empregando balança de infravermelho modelo ID 200 (Marte[®], SP, Brasil). Empregou-se massa de 3,00 g do cereal triturado, peneirado e homogeneizado, e a porcentagem de umidade da amostra informada automaticamente pelo equipamento. O teor de umidade foi expresso como média ± desvio padrão, a partir de determinações em triplicata.

2.2.3. Determinação de Fumonisia B₁

2.2.3.1. Extração e Purificação

Na extração, em um tubo de centrifugação de polipropileno de 50 mL Nalgene[®] (Thermo Scientific, Rochester, NY, USA), foram adicionados 10 g de amostra de arroz, 20 mL de solução de acetonitrila 50% e 0,2 mL de ácido acético glacial, seguido de

agitação em vórtex por 1 minuto, e posterior adição de 2,5 g de sulfato de sódio anidro e 0,5 g de cloreto de sódio, novamente agitação em vórtex por 1 minuto e centrifugação à 7500 rpm durante 2 minutos.

Na etapa de purificação, 5 mL do extrato obtido na etapa de extração, 0,3 g de sulfato de sódio anidro e 0,1 g de Celite[®] foram adicionados à um tubo de centrifugação de polipropileno de 50 mL, e este agitado em vórtex por 30 segundos e centrifugado à 7500 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm Millex[®] (Millipore, Barueri, SP, Brasil), e então realizada a reação de derivatização.

2.2.3.2. Derivatização

A reação de derivatização da fumonisina B₁ foi de acordo com a AOAC (2005). O reagente de derivatização foi preparado empregando-se 40 mg de OPA, este dissolvido em 1 mL de metanol, diluídos com 5 mL de solução de tetraborato de sódio 0,1 M (pH 8,9 – 9,1), e então adicionados 50 µL de 2-mercaptoetanol. O reagente foi estocado em frasco âmbar, envolto em papel de alumínio, protegido da luz e em temperatura ambiente, por no máximo até uma semana.

Alíquota de 225 µL do reagente de derivatização foi adicionada à um *vial* de 1,5 mL contendo 25 µL de extrato da amostra purificado, e então mantidos em banho de ultra-som por 30 segundos em temperatura ambiente e protegidos da luz. Dentro de 4 minutos, após a adição do reagente de derivatização, realizou-se a injeção no cromatógrafo a líquido.

2.2.3.3. Análise Cromatográfica

Na separação, detecção e quantificação da fumonisina B₁ utilizou-se um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kioto, Japão), com sistema quaternário de bombeamento de solvente, modelo LC 10AT VP, detector de fluorescência RF 10A XL em comprimentos de onda de 335 nm (excitação) e 440 nm (emissão), injetor automático SIL 10A, e coluna cromatográfica ODS Hypersil (250 x 4,6 mm; partículas de 5 µm) (Thermo, Reino Unido). A temperatura da coluna durante as análises manteve-se em 20°C, e o tempo total de corrida foi de 20 minutos. A fase móvel empregada foi acetonitrila: tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico, na proporção 44:56, respectivamente, em eluição isocrática, vazão de 1,0 mL.min⁻¹, e volume de injeção de 10 µL.

2.2.3.4. Detecção e Quantificação de Fumonisina B₁

A detecção de fumonisina B₁ foi realizada pela comparação entre os tempos de retenção da amostra e do padrão (AOAC, 2005), de $13,5 \pm 0,5$ minutos, e a quantificação através do método de padronização externa, utilizando-se as áreas dos picos cromatográficos. Empregaram-se curvas de calibração em extrato de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, na faixa de 100 a 2500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, cuja linearidade e efeito de matriz foram comprovados. A concentração de fumonisina B₁ foi expressa como média $\pm$ desvio padrão, a partir de determinações em triplicata.

2.3. Descontaminação do Material

Todo material foi tratado com solução de hipoclorito de sódio 5% por pelos menos 12 horas antes de ser descartado, seguido de acetona, e lavagem com água (BRASIL, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é classificado em dois grupos de acordo com a sua forma de apresentação, arroz em casca e arroz beneficiado, segundo o Regulamento Técnico do Arroz (BRASIL, 2009).

O arroz beneficiado é o produto maduro o qual submetido ao processo de beneficiamento, encontra-se desprovido, no mínimo, de sua casca, com um percentual máximo admitido de 14% de umidade, apresentando os subgrupos – polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral (BRASIL, 2009).

No subgrupo polido enquadra-se o arroz, que ao ser beneficiado, retiraram-se o germe, o pericarpo e a maior parte da camada interna, a aleurona (BRASIL, 2009). Um total de 20 amostras de arroz do subgrupo polido foi analisado, e as embalagens indicaram amostras de diferentes Estados brasileiros, como Pernambuco, São Paulo e Tocantins, sendo 60% das amostras procedentes do Estado do Rio Grande do Sul. Verificou-se que o teor de umidade nas amostras variou entre 6,40 e 9,53% (Tabela 1), em conformidade com o percentual máximo admitido pela legislação brasileira.

Das 20 amostras de arroz polido analisadas, apenas uma apresentou contaminação por fumonisina B₁, com nível médio de 258,69 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Tabela 1).

A equação da reta de regressão linear da curva de calibração empregada na quantificação de fumonisina B₁ em arroz polido foi $y = 979,22x + 5131,1$, onde y = área

do pico cromatográfico e x = concentração de fumonisina B₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9998.

Tabela 1 – Concentração de fumonisina B₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) e teor de umidade (%) em amostras de arroz polido, segundo o Estado de origem.

Amostra	Estado de Origem*	Umidade (%)**	Fumonissina B ₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)**
01	Pernambuco	7,57 $\pm$ 0,55	nd
02	Rio Grande do Sul	6,40 $\pm$ 1,20	nd
03	Rio Grande do Sul	6,80 $\pm$ 0,56	nd
04	Rio Grande do Sul	6,57 $\pm$ 0,40	nd
05	Rio Grande do Sul	6,60 $\pm$ 0,00	nd
06	Rio Grande do Sul	6,70 $\pm$ 0,10	nd
07	Rio Grande do Sul	6,63 $\pm$ 0,06	nd
08	Rio Grande do Sul	7,40 $\pm$ 0,40	nd
09	Rio Grande do Sul	7,53 $\pm$ 0,61	258,69 $\pm$ 5,74
10	Rio Grande do Sul	7,40 $\pm$ 0,00	nd
11	Rio Grande do Sul	8,93 $\pm$ 0,35	nd
12	Rio Grande do Sul	9,27 $\pm$ 0,35	nd
13	Rio Grande do Sul	9,53 $\pm$ 0,46	nd
14	São Paulo	6,33 $\pm$ 0,15	nd
15	São Paulo	8,33 $\pm$ 0,61	nd
16	São Paulo	7,77 $\pm$ 0,61	nd
17	São Paulo	8,03 $\pm$ 0,46	nd
18	São Paulo	9,30 $\pm$ 0,53	nd
19	São Paulo	7,37 $\pm$ 0,83	nd
20	Tocantins	8,87 $\pm$ 0,40	nd

*informado na embalagem do produto; **média $\pm$ desvio padrão (n = 3); nd: não detectado.

Park et al. (2005) ao analisarem um total de 88 amostras de arroz polido de duas diferentes regiões da República da Coréia, reportaram a ocorrência de fumonisina B₁ em duas amostras, em concentrações variando entre 48,2 e 60,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, com nível médio de 54,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

O arroz parboilizado polido é o arroz polido que foi submetido ao processo de parboilização, que consiste na imersão do arroz ainda em casca em água potável, a uma temperatura acima de 58°C, seguido de gelatinização parcial ou total do amido, e

secagem (BRASIL, 2009). Analisaram-se 10 amostras de arroz parboilizado polido, e as embalagens indicaram amostras dos Estados de Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. A porcentagem de umidade nas amostras variou de 6,13 a 8,73% (Tabela 2), estando de acordo com a legislação brasileira.

Verificou-se que das 10 amostras analisadas, duas apresentaram contaminação por fumonisina B₁, com níveis médios entre 109,36 e 162,99 µg.kg⁻¹, o que representou uma contaminação por fumonisina B₁ em 20% das amostras de arroz parboilizado polido analisadas (Tabela 2). A equação da reta de regressão linear da curva de calibração empregada na quantificação de fumonisina B₁ em arroz parboilizado polido foi $y = 923,76x - 18662$, onde y = área do pico cromatográfico e x = concentração de fumonisina B₁ (µg.kg⁻¹), com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9997.

Tabela 2 – Concentração de fumonisina B₁ (µg.kg⁻¹) e teor de umidade (%) em amostras de arroz parboilizado polido, segundo o Estado de origem.

Amostra	Estado de Origem*	Umidade (%)**	Fumonissina B ₁ (µg.kg ⁻¹)**
01	Pernambuco	6,63 ± 0,40	nd
02	Rio Grande do Sul	6,60 ± 0,30	nd
03	Rio Grande do Sul	7,00 ± 0,40	nd
04	Rio Grande do Sul	6,13 ± 0,57	nd
05	Rio Grande do Sul	7,50 ± 0,00	109,36 ± 8,85
06	Rio Grande do Sul	8,73 ± 0,31	nd
07	Rio Grande do Sul	8,53 ± 0,23	nd
08	Rio Grande do Sul	7,60 ± 0,40	nd
09	Santa Catarina	7,85 ± 0,06	162,99 ± 10,54
10	São Paulo	7,23 ± 0,35	nd

*informado na embalagem do produto; **média ± desvio padrão (n = 3); nd: não detectado.

O arroz integral é o produto do qual somente a casca foi retirada (BRASIL, 2009). No comércio do município de Araraquara, SP, foi possível a obtenção de apenas 6 diferentes amostras de arroz integral, e destas amostras 50% eram procedentes do Estado de São Paulo. Todas as amostras apresentaram teor de umidade abaixo do limite de 14% admitido pela legislação, variando entre 6,93 a 7,40% (Tabela 3).

Detectou-se a presença de fumonisina B₁ em uma amostra de arroz integral. A equação da reta de regressão linear da curva de calibração empregada para a

quantificação de fumonisina B₁ foi $y = 1032,4x - 8055,2$, onde y = área do pico cromatográfico e x = concentração de fumonisina B₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9997. O nível médio de fumonisina B₁ quantificado na amostra de arroz integral foi de $111,24 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentração de fumonisina B₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) e teor de umidade (%) em amostras de arroz integral, segundo o Estado de origem.

Amostra	Estado de Origem*	Umidade (%)**	Fumonissina B ₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)**
01	Rio Grande do Sul	$7,05 \pm 0,07$	nd
02	Rio Grande do Sul	$7,27 \pm 0,61$	nd
03	Rio Grande do Sul	$7,40 \pm 0,00$	nd
04	São Paulo	$6,93 \pm 0,25$	nd
05	São Paulo	$7,25 \pm 0,35$	$111,24 \pm 10,93$
06	São Paulo	$7,30 \pm 0,28$	nd

*informado na embalagem do produto; **média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$); nd: não detectado.

O arroz parboilizado integral é o produto cujos grãos apresentam-se desprovidos apenas de sua casca e que foram submetidos à parboilização (BRASIL, 2009). Analisou-se arroz parboilizado integral dos Estados de Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, segundo informações presentes na embalagem do produto, totalizando 15 diferentes amostras. Todas elas apresentaram porcentagem de umidade de acordo com a legislação, abaixo de 14%, entre 5,77 e 8,00% (Tabela 4).

Verificou-se a ocorrência de fumonisina B₁ em três amostras de arroz parboilizado integral. No entanto, em uma das amostras, número 04, o nível da micotoxina, $49,24 \pm 2,73 \mu\text{g.kg}^{-1}$, esteve-se abaixo do limite de detecção definido para o método ($50 \mu\text{g.kg}^{-1}$); e em outra amostra, número 07, foi possível a detecção da fumonisina B₁, $64,84 \pm 0,80 \mu\text{g.kg}^{-1}$, porém em uma concentração menor que o limite de quantificação ($100 \mu\text{g.kg}^{-1}$), o que implicou na quantificação do nível da micotoxina sem exatidão e precisão.

A equação da reta de regressão linear da curva de calibração empregada para a quantificação de fumonisina B₁ foi $y = 964,62x + 47003$, onde y = área do pico cromatográfico e x = concentração de fumonisina B₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), com coeficiente de

determinação (R^2) de 0,9959. Em apenas uma amostra de arroz parboilizado integral foi quantificada a fumonisina B₁, cuja contaminação foi de 110,63 µg.kg⁻¹.

Tabela 4 – Concentração de fumonisina B₁ (µg.kg⁻¹) e teor de umidade (%) em amostras de arroz parboilizado integral, segundo o Estado de origem.

Amostra	Estado de Origem*	Umidade (%)**	Fumonissina B ₁ (µg.kg ⁻¹)**
01	Pernambuco	6,30 ± 0,35	nd
02	Pernambuco	6,27 ± 0,06	nd
03	Pernambuco	6,83 ± 0,23	nd
04	Rio Grande do Sul	7,40 ± 0,00	< LD
05	Rio Grande do Sul	5,77 ± 0,23	nd
06	Rio Grande do Sul	6,80 ± 0,40	nd
07	Rio Grande do Sul	7,05 ± 0,49	< LQ
08	Rio Grande do Sul	6,50 ± 0,44	nd
09	Rio Grande do Sul	7,87 ± 0,61	nd
10	Rio Grande do Sul	7,53 ± 0,40	nd
11	Rio Grande do Sul	7,43 ± 0,29	nd
12	Santa Catarina	7,30 ± 0,28	nd
13	São Paulo	8,00 ± 0,28	110,63 ± 9,67
14	São Paulo	6,65 ± 0,07	nd
15	São Paulo	7,70 ± 0,28	nd

*informado na embalagem do produto; **média ± desvio padrão (n = 3); nd: não detectado; LD: limite de detecção (50 µg.kg⁻¹); LQ: limite de quantificação (100 µg.kg⁻¹).

Considerando o total de 51 amostras analisadas, dos quatro subgrupos de arroz, verificou-se contaminação por fumonisina B₁ em aproximadamente 12% das amostras de arroz, com uma concentração média de 150,58 ± 64,58 µg.kg⁻¹. Até o momento, a partir de levantamento bibliográfico realizado, o presente estudo foi o primeiro a relatar a ocorrência de fumonisina B₁ em arroz comercializado no Brasil, o que implica na necessidade de mais estudos a fim de uma avaliação da incidência da micotoxina no arroz nacional.

Dados de ocorrência de toxinas de *Fusarium* em alimentos, de nove países da União Européia, indicaram a ocorrência de fumonisina B₁ em 2% do total de 197 amostras de arroz, com nível máximo de 77 µg.kg⁻¹ (BRERA e MIRAGLIA, 2003),

estes dados corroboraram com os do presente estudo de que o arroz apresenta uma baixa frequência de ocorrência de fumonisina B₁.

Patel et al. (1996) reportaram contaminação por fumonisinas B₁ e B₂ em 1 amostra de arroz, cuja concentração foi de 28 µg.kg⁻¹, do total de 4 amostras analisadas do Reino Unido, no entanto, em outro estudo com amostras de arroz do Reino Unido, Patel et al. (1997) reportaram a ausência de fumonisinas nas amostras. Em estudo com amostras provenientes dos Estados Unidos da América, foi reportado níveis médios de 136,87 e 4080 µg.kg⁻¹ de fumonisina B₁ em arroz em casca (SCOTT, LAWRENCE e LOMBAERT, 1999). Tanaka et al. (2007) relataram a ocorrência de fumonisina B₁ em 8 amostras de arroz dos Estados Unidos da América, de um total 20 amostras analisadas, cujas concentrações foram menor ou igual a 4300 µg.kg⁻¹, no entanto, o estudo não especificou o tipo de arroz analisado. Em estudo com arroz branco e arroz marrom, consumidos na Coreia do Sul, Seo et al. (2009) não detectaram fumonisina B₁ nas 12 amostras analisadas de cada tipo de arroz.

Na Quinquagésima Sexta Reunião do *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), em Geneva em 2001, em avaliação sobre a ocorrência de micotoxinas em alimentos, estimou-se uma ingestão diária de 1,0 µg de fumonisina B₁ por kg de peso corpóreo, através da dieta latino-americana. Na avaliação, consideraram-se dados submetidos pelos países, Argentina, Brasil, Uruguai, Canadá, Estados Unidos da América, Dinamarca, Suécia, Reino Unido e China, e o pressuposto de que todo milho consumido continha fumonisina B₁ em concentração média de 1.400 µg.kg⁻¹ (JECFA, 2002).

Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF 2008-2009, o consumo alimentar médio *per capita* de arroz no Brasil foi de 165,0 g do cereal por dia (IBGE, 2011). Considerando o nível de fumonisina B₁ determinado no arroz polido, de 258,69 µg.kg⁻¹, estimou-se uma ingestão diária de 0,71 µg de fumonisina B₁ por kg de peso corpóreo, para um indivíduo adulto de 60 kg. O valor estimado representa 35,5% da ingestão diária tolerável máxima provisória estabelecida pelo JECFA, de 2 µg.kg⁻¹ de peso corpóreo para fumonisinas B₁, B₂ e B₃ sozinhas ou combinadas, estabelecida a partir de estudos de toxicidade renal em roedores, considerando um NOEL (*No-Observed-Effect Level*) de 0,2 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo por dia e fator de segurança de 100 (IPCS, 2002).

4. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram a ocorrência de fumonisina B₁ em arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, comercializados no município de Araraquara, SP. Verificou-se contaminação por fumonisina B₁ em aproximadamente 12% do total de 51 amostras analisadas, cuja concentração de fumonisina B₁ variou entre 109,36 e 258,69 µg.kg⁻¹. Os resultados indicam a necessidade de mais estudos sobre a avaliação da ocorrência de fumonisina B₁ em arroz, a fim de corroborarem sobre a incidência desta micotoxina no arroz nacional.

5. REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.K.; OCAMB, C.M. First report of production of fumonisin B₁ by *Fusarium polyphialidicum* collected from seeds of *Pinus strobus*. **Plant Disease**, v. 79, p. 642-645, 1995.
- ALMEIDA, T.X.; KELLER, K.M.; OLIVEIRA, A.A.; FARNOCHI, C.; CHULZE, S.; ROSA, C.A.R. Isolamento e identificação de espécies do gênero *Fusarium* em amostras de arroz do estado do Maranhão. **Revista de Ciências da Vida**, v. 28, suplemento, p. 141-143, 2008.
- ANDRADE, E.T.; COUTO, S.M.; QUEIROZ, D.M.; FARONI, L.R.D.; PEIXOTO, A.B. Qualidade de sementes de milho armazenadas em silo metálico cilíndrico. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 28, p. 23-30, 2003.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18th ed. Gaithersburg: AOAC, 2005.
- BACON, C.W.; NELSON, P.E. Fumonisins production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 6, p. 514-521, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, safra 2010/2011, quarto levantamento, janeiro/2011**. Brasília: CONAB, 2011.a

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 6 de 16 de Fevereiro de 2009. Regulamento técnico do arroz. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 18 fev. 2009. Seção 1. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 3 fev. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7 de 18 de Fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados para micotixnas em alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 22 fev. 2011. Seção 1, p. 72. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html. Acesso em: 10 maio 2011.b

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. p. 758.

BRERA, C.; MIRAGLIA, M. (Co-ord.). Task 3.2.10 “Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins if food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States”. Subtask III: fumonisins. In: GARIES, M. **SCOOP TASK 3.2.10: “Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins if food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States”**: final report. [s. l.]: Commission European, 2003. p. 483-577. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2011.

BUCCI, T.J.; HANSEN, D.K.; LABORDE, J.B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B₁. **Natural Toxins**, v. 4, p. 51-52, 1996.

CASTEEL, S.W.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Chronic effects of dietary fumonisin on the heart and pulmonary vasculature of swine. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 23, p. 518–524, 1994.

COELHO, C.S.P.; FURLONG, E.B.; ALMEIDA, T. L. Migração de micotoxinas durante a parboilização do arroz. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 1, 2, n. 2, p. 39-44, 1999.

DILKIN, M.; MÜRMAN, L.; KOWALSKI, C.H.; DILKIN, P.; ARAÚJO, D.D.F.; MALLMANN, C.A. Prevalência de ocratoxina A em arroz utilizado na alimentação humana. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, 5., 2003. Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 2003. Disponível em: <http://www.lamic.ufsm.br/papers/12a.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2009.

DORS, G.C.; BIERHALS, V.S.; BADIALE-FURLONG, E. Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 172-177, 2011.

DORS, G.C.; PINTO, L.A.A.; FURLONG, E.B. Migration of mycotoxins into rice starchy endosperm during the parboiling process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 433-437, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **FAOSTAT**: food and agricultural commodities production, 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 4 fev. 2012.

FURLONG, E.B.; SOARES, L.A.S.; VIEIRA, A.P.; DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 105-111, 1999.

GELDERBLOM, W.C.A.; KRIEK, N.P.; MARASAS, W.F.; THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1247-1251, 1991.

HARRISON, L.R.; COLVIN, B.M.; GREEN, J.T.; NEWMAN, L.E.; COLE, J.R. Pulmonary edema and hyfrotorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 217-221, 1990.

HOELTZ, M.; FAGUNDES, C.A.; ALCAYAGA, E.A.L.; NOLL, I.B. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 803-808, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/pofanalise_2008_2009.pdf.pdf. Acesso em: 2 fev. 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. **Agents classified by the IARC monographs, volumes 1-102**. List of classifications by alphabetical order. França, 2011. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Listagentsalphorder.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2012.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - IPCS. Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) – Monographs and Evaluations. **Fumonisin**. WHO, 2002. (WHO Food Additives Series 47). Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm>. Acesso em: 20 maio 2009.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES - JECFA. **Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Geneva: WHO, 2002. p. 16-27. (WHO Technical Reports Series 906). Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_906.pdf. Acesso em: 09 dez. 2011.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 131-139, 2007.

MARASAS, W.F.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLOM, W.C.; COETZER, J.A.; THIEL, P.G.; VAN DER LUGT, J.J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by

fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 197-203, 1988.

MARASSI, A.C.; BARBOSA, T.S.; KELLER, L.A.M.; RODRIGUES, M.A.A.; KRÜGER, C.D.; ROSA, C.A.R. Micobiota isolada de amostras de arroz provenientes do estado do Maranhão destinadas ao consumo humano, em áreas de ocorrência de beribéri. **Revista de Ciências da Vida**, v. 28, suplemento, p. 150-152, 2008.

MIRANDA, H.A.S.; ZENEON, O.; PENTEADO, M. de V.C. Amostragem e preparação de amostras para análise de alimentos. In: ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M. de V.C. **Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 20-45.

NELSON, P.E. Taxonomy and biology of *Fusarium verticillioides*. **Mycopathologia**, v. 117, p. 29-36, 1992.

NORRED, W.P. Fumonisin-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 38, p. 309-328, 1993.

NORRED W.P.; VOSS K.A. Toxicity and role of fumonisin in animal diseases and human esophageal cancer. **Food Protection**, v. 57, 522-527, 1994.

NUNES, I.T.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIN, T.E.; FURLONG, E.B. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.

PARK, J.W.; CHOI, S.Y.; HWANG, H.J.; KIM, Y.B. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 305-314, 2005.

PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M.; GLEADLE, A.E.. Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 2, p. 187-191, 1997.

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

ROSA, C.A.R.; KELLER, K.M.; OLIVEIRA, A.A.; ALMEIDA, T.X.; KELLER, L.A.M.; MARASSI, A.C.; KRUGER, C.D.; DEVEZA, M.V.; MONTEIRO, B.S.; NUNES, L.M.T.; ASTORECA, A.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; EIFERT, E.C.; LIMA, T.A.S.; MODERNELL, K.G.; NUNES, F.I.B.; GARCIA, A.M.; LUZ, M.S.; OLIVEIRA, D.C.N. Production of citreoviridin by *Penicillium citreonigrum* strains associated with rice consumption and beriberi cases in the Maranhão State, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 2, p. 241-248, 2010.

ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; OSWEILLER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumisinins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 3225-3226, 1990.

SANTOS, E.A.; GONÇALVES, G.A.A.; ALMEIDA, M.I.; SILVA, K.P.; GARCIA, J.C.; VARGAS, E.A. Ocorrência de micotoxinas em frações do beneficiamento de arroz. **Revista de Ciências da Vida**, v. 28, suplemento, p. 177-179, 2008.

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

SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A.; LOMBAERT, G.A. Studies on extraction of fumonisinins from rice, corn-based foods and beans. **Mycotoxin Research**, v. 15, p. 50-60, 1999.

SEO, E.; YOON, Y.; KIM, K.; SHIM, W.B.; KUZMINA, N.; OH, K.S.O.; LEE, J.O.; KIM, D.S.; SUH, J.; LEE, S.H.; CHUNG, K.H.; CHUNG D.H. Fumonisinins B₁ e B₂ in agricultural products consumed in South Korea: an exposure assessment. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 436-440, 2009.

SEO, J.A.; LEE, YW. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1331-1334, 1999.

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

SIMIONATO, E.M.R.S.; ASTRAY, R.M.; SYLOS, C.M. Ocorrência de ocratoxina A e aflatoxinas em arroz. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 2, p. 123-130, 2003.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

TANAKA, K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; KUSHIRO, M. Mycotoxins in rice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 59-66, 2007.

THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLOM, W.C.A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, v. 117, p. 3-9, 1992.

CONCLUSÕES

- ✓ As condições cromatográficas para separar, detectar e quantificar a fumonisina B₁ em arroz, empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência e derivatização pré-coluna, foram estabelecidas;
- ✓ Os parâmetros experimentais pH, tempo e temperatura influenciaram significativamente sobre a estabilidade do derivado fumonisina B₁-*orto*-ftaldialdeído;
- ✓ Verificou-se a máxima fluorescência emitida pelo derivado fumonisina B₁-*orto*-ftaldialdeído com o emprego, na derivatização, de solução de tetraborato de sódio 0,1 M pH 9,0 e reação em 2 minutos; e nas análises cromatográficas, de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 3,3 na fase móvel e temperatura da coluna cromatográfica de 20°C;
- ✓ Desenvolveu-se um novo método analítico – rápido, fácil, economicamente viável e com menor geração de resíduos orgânicos, para a determinação de fumonisina B₁ em arroz, com referência no procedimento *QuEChERS* e empregando metodologia de planejamento fatorial associada à análise de superfície de resposta;
- ✓ A partir de validação intralaboratorial verificou-se seletividade do método analítico para fumonisina B₁, linearidade na faixa entre 100 e 2500 µg.kg⁻¹, efeito de matriz significativo, exatidão e precisão do método analítico, baixo limite de detecção, 50 µg.kg⁻¹, e limite de quantificação, 100 µg.kg⁻¹, apropriado para a determinação de fumonisina B₁ em arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral. As porcentagens de recuperação do método foram de 100,48, 104,97, 87,60 e 91,76% para o arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral, respectivamente;
- ✓ Detectou-se fumonisina B₁ em aproximadamente 12% do total de 51 amostras de arroz polido, parboilizado polido, integral e parboilizado integral analisadas, cuja concentração variou entre 109,36 e 258,69 µg.kg⁻¹.