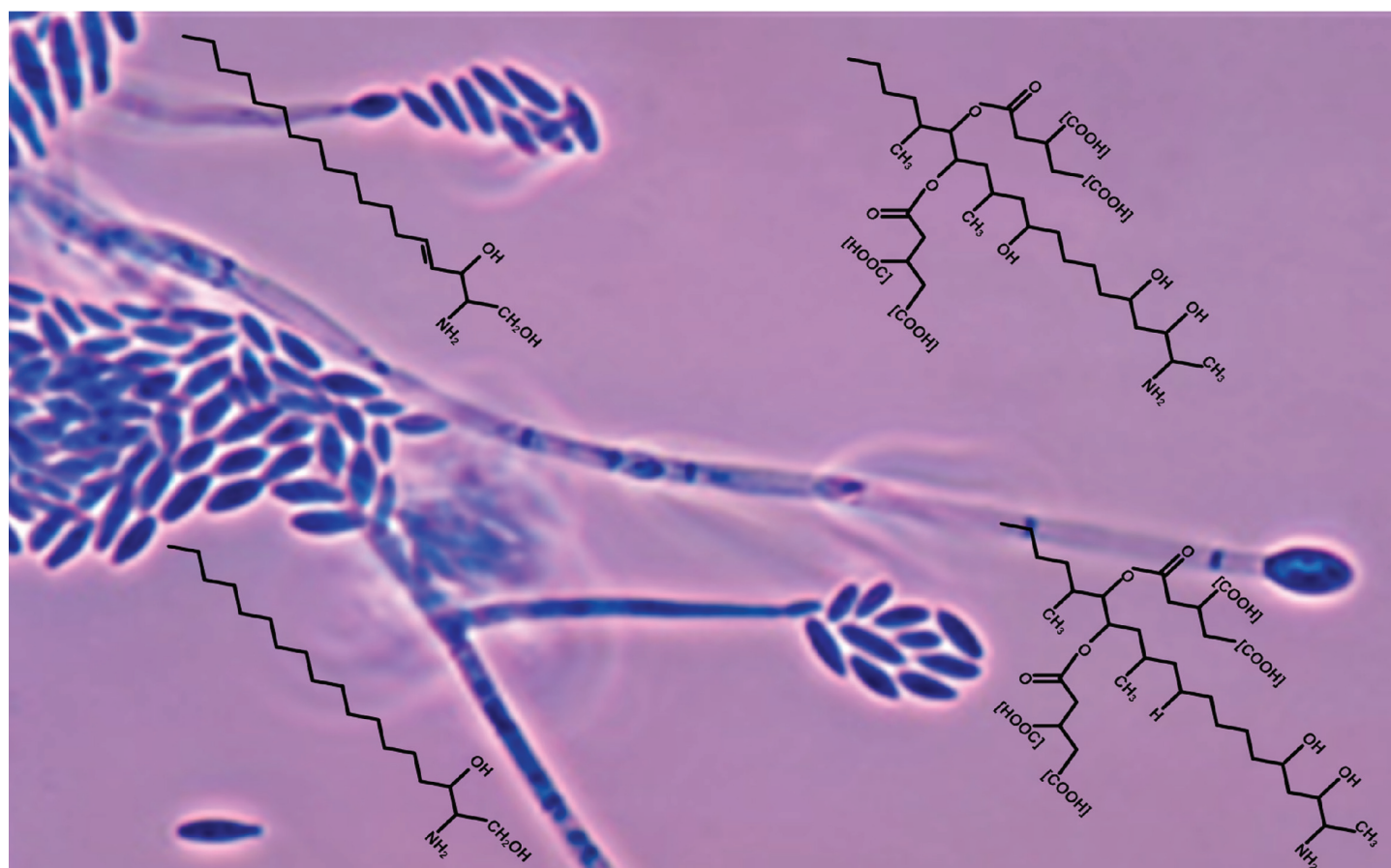


LILIANA JOÃO GATÕES DA SILVA

AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DO GRAU DE EXPOSIÇÃO
DE DISTINTOS TIPOS DE POPULAÇÕES ÀS FUMONISINAS B₁ E B₂:
ALIMENTOS CONTAMINADOS, TEOR NA URINA
E RELAÇÃO ESFINGANINA-ESFINGOSINA



Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra

2008

**AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DO GRAU DE EXPOSIÇÃO
DE DISTINTOS TIPOS DE POPULAÇÕES ÀS FUMONISINAS B₁ E B₂:
ALIMENTOS CONTAMINADOS, TEOR NA URINA
E RELAÇÃO ESFINGANINA-ESFINGOSINA**

Capa: *Photomicrograph* onde se observam conidióforos e conídeos do fungo *Fusarium verticillioides* (<http://www.ars.usda.gov/is/pr/2006/061005.htm>) e estruturas químicas da Fumonisina B₁ e B₂ (adaptado de Fumonisins: <http://micotoxinas.com.br/fumofacts.htm>), esfingosina e esfinganina (adaptado de Solfrizzo *et al.*, 1997).

LILIANA JOÃO GATÕES DA SILVA

**AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DO GRAU DE EXPOSIÇÃO
DE DISTINTOS TIPOS DE POPULAÇÕES ÀS FUMONISINAS B₁ E B₂:
ALIMENTOS CONTAMINADOS, TEOR NA URINA
E RELAÇÃO ESFINGANINA-ESFINGOSINA**

*Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade de Coimbra para prestação de Provas
de Doutoramento em Ciências e Tecnologias da Saúde,
especialidade de Nutrição e Química dos Alimentos.*

Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra
2008

LILIANA JOÃO GATÕES DA SILVA

**EVALUATION AND VALIDATION OF THE EXPOSURE DEGREE
OF DIFFERENT POPULATIONS TO FUMONISINS B₁ AND B₂:
CONTAMINATED FOODS, LEVELS IN URINE,
AND SPHINGANINE-SPHINGOSINE RATIO**

Doctoral Dissertation

Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra
2008

Este trabalho foi realizado na qualidade de bolsista de doutoramento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do POCI 2010 – Formação Avançada para a Ciência – Medida IV.3 (referência SFRH/BD/19382/2004).

Foi efectuado no Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob orientação da Professora Doutora Celeste de Matos Lino e da Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena.

Aos meus pais

Ao Marco

“Nenhum caminho de flores conduz à glória”

Jean de La Fontain

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Celeste de Matos Lino expresso o meu agradecimento pelos ensinamentos transmitidos, pela dedicação, pela exigência e pela confiança que depositou em mim.

À Professora Doutora Angelina Pena agradeço igualmente os ensinamentos que me transmitiu, as horas que passámos no laboratório a “desbravar” as fumonisinas, a paciência, o empenho e o optimismo.

Ao Professor Doutor Jordi Mañes agradeço a disponibilidade que sempre mostrou em me receber no Laboratório Toxicologia e Química dos Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Valência, Espanha e a sua simpatia e atenção.

À Professora Doutora Mónica Fernández gostaria de agradecer a simpatia, a dedicação sempre demonstrada e todos os conhecimentos transmitidos aquando da minha estada em Valência.

A todos os que fazem parte do Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sobretudo à Professora Doutora Maria Irene O. C. B. Noronha da Silveira, ao Professor Doutor Fernando Ramos, à Professora Doutora Maria da Conceição Castilho, à Senhora Doutora Maria de Lurdes Baeta, à D. Isabel Lemos, à D. Isabel Loureiro, à D. Anabela e a todos os que passaram pelo laboratório, agradeço a simpatia e o apoio prestado.

A todos os que fazem parte do laboratório de Valência, ou que por lá passaram, o meu agradecimento pela imensa simpatia com que me receberam, pela preocupação em ajudar no que fosse necessário e pelos bons momentos passados nos 5 meses que vivi naquela cidade.

À FCT agradeço a bolsa de doutoramento que me foi concedida e todo o apoio financeiro.

Ao Marco o meu agradecimento por ser o meu porto de abrigo, o meu aconchego, a minha força para travar mais esta etapa. Agradeço-lhe a paciência que teve nos momentos mais difíceis, a compreensão que sempre demonstrou e a sua ajuda imprescindível. Obrigada por existires na minha vida!

Aos meus pais, o meu agradecimento porque para mim são os melhores pais do mundo e porque lhes devo tudo aquilo que sou hoje. Por serem o meu pilar, a minha base de construção pessoal e profissional. Sem eles nada teria sido possível. Agradeço-lhes sobretudo a forma como me educaram e espero um dia conseguir educar os meus filhos do mesmo modo.

À restante família, sem esquecer a minha avó Luísa, que me ensinou que devemos sempre lutar pelo melhor, e que apesar de já não estar comigo, está sempre no meu coração.

Aos meus amigos, o apoio, a presença, mesmo que não efectiva, pois soube e sei que posso sempre contar com eles e eles comigo. Neste caso, é mais elas e elas sabem quem são. Obrigada meninas!

ABREVIATURAS

Na abreviatura da maioria dos termos adoptou-se a terminologia inglesa.

ACCQ.Fluor	6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate
ACN	Acetonitrile
AFs	Aflatoxins
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
API	Atmospheric pressure ionization
CZE	Capillary zone electrophoresis
DNA	Deoxyribonucleic acid
DON	Deoxynivalenol
EC	Esophageal cancer
EDI	Estimated daily intake
ELEM	Equine leukoencephalomalacia
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMAN	European Mycotoxin Awareness Network
ESI	Electrospray ionization
EU	European Union
FAB	Fast Atom Bombardment
FAO/WHO	Food and Agriculture Organization of the United Nations/ /World Health Organization
FB ₁	Fumonisin B ₁
FB ₂	Fumonisin B ₂
FB ₃	Fumonisin B ₃
FB ₄	Fumonisin B ₄

FBs	Fumonisin
FD	Fluorescence detection
FDA	Food and Drug Administration
FID	Flame ionization detector
FLA	Fluorescamina
GC	Gas chromatography
HFB ₁	Hydrolyzed fumonisin B ₁
HPLC	High pressure liquid chromatography
HPTLC	High performance thin layer chromatography
HT-2	HT-2 toxin
IAC	Immunoaffinity columns
IARC	International Agency for Research on Cancer
INE	Instituto Nacional de Estadística
IS	Ionspray
LC	Liquid chromatography
LIF	Laser induced fluorescence
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LSI	Liquid secondary ion
MCE	2-mercaptoethanol
MeOH	Methanol
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Mass spectrometry
n.d.	Not detected
NAC	N-acetyl-cystein
NBD-F	4-fluoro-7-nitrobenzofurazan
NDA	Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde
NIV	Nivalenol
NTD	Neural tube defects
OPA	Orto-phthaldialdehyde
OTA	Ochratoxin A

PB	Particle beam
PBS	Phosphate buffer solution
PDI	Probable daily intake
PHFB ₁	Partially hydrolyzed fumonisin B ₁
PMTDI	Provisional maximum tolerable daily intake
PPE	Porcine pulmonary edema
R ² , r ²	Correlation coefficient
RSD	Relative standard deviation
Sa	Sphinganine
Sa 1-P	Sphinganine 1-phosphate
SAX	Strong anion exchange
SD	Standard deviation
SIM	Single ion monitoring
So	Sphingosine
So 1-P	Sphingosine 1-phosphate
SPE	Solid phase extraction
T-2	T-2 toxin
TCA	Tricarballic acid
TDI	Tolerable daily intake
TFA	Trifluoroacetic acid
TLC	Thin layer chromatography
TS	Thermospray
ZEA	Zearalenone

RESUMO

As fumonisinas (FBs) são micotoxinas produzidas pelo *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) e pelo *F. proliferatum*, ambos isolados no milho. A fumonisina B₁ (FB₁), seguida da B₂ (FB₂), é a mais abundante e a mais tóxica, ocorrendo a nível mundial.

O modo de acção das FBs respeita à sua interferência com o metabolismo dos esfingolípidos, podendo alterar a concentração e a proporção entre as bases esfingóides – esfinganina (Sa) e a esfingosina (So). No Homem, o consumo de alimentos contaminados está epidemiologicamente relacionado com o aparecimento de cancro esofágico (EC). A FB₁ foi classificada como possivelmente carcinogénica para o Homem (grupo 2B).

Não existe uma legislação global para regular os limites máximos permitidos no milho e derivados. Em 2006 (EC N.º 1881/2006), a Comissão Europeia fixou limites máximos para a soma de FB₁ e FB₂ que em 2007 (EC N.º 1126/2007) foram duplicados para algumas matrizes alimentares. A mesma Comissão estabeleceu uma ingestão diária tolerável (TDI) de 2 µg kg⁻¹ peso corporal dia⁻¹ para a FB₁ e FB₂ (EC N.º 856/2005).

A avaliação da exposição de distintas populações às FBs é primordial para a manutenção da saúde pública. Esta pode efectuar-se calculando a respectiva ingestão diária ou determinando biomarcadores, como os níveis de FBs livres ou a razão Sa/So, em matrizes biológicas.

A presente dissertação encontra-se estruturada em duas partes. Na Parte Teórica, subdividida nos Capítulos I e II e redigida em português, apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre as FBs, respectivos biomarcadores, e metodologias analíticas para a sua determinação. Na Parte Experimental, subdividida

no Capítulo III, redigido em português, e nos Capítulos IV e V, redigidos em inglês, apresentam-se os trabalhos realizados na determinação de FBs em milho e derivados e na determinação de FBs e da razão Sa/So em urina humana, respectivamente.

O Capítulo I aborda aspectos relacionados com as características gerais das FBs como sejam os fungos produtores, aspectos físico-químicos, modo de acção, efeitos biológicos, interacções com outras micotoxinas, presença em alimentos, processos de descontaminação e, por fim, os aspectos legislativos. Este capítulo refere ainda a revisão das metodologias analíticas aplicadas na determinação destas micotoxinas em alimentos.

Com o Capítulo II pretende-se rever a utilidade e validade da aplicação dos biomarcadores, as próprias FBs e a razão Sa/So, a diferentes amostras biológicas. São também abordadas as diferentes metodologias referenciadas usadas nesta determinação.

No Capítulo III comparam-se dois procedimentos no que respeita à extracção e derivatização para a determinação de FB₁ e FB₂ em milho e derivados destinados ao consumo humano. O método de análise optimizado consistiu em extracção com metanol:água, purificação com colunas de imunoafinidade (IAC) e derivatização com naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (NDA). Para separação e identificação aplicou-se cromatografia líquida (LC) com detecção por fluorescência (FD), massa (MS) e massa-massa (MS-MS). Apesar do detector MS-MS permitir melhor sensibilidade e precisão, todos possibilitaram resultados de exactidão e precisão de acordo com os exigidos pela legislação europeia.

Foram avaliadas 67 amostras de milho e derivados e 30 amostras de broa adquiridas na zona Centro de Portugal. A presença de FBs foi observada em 22,4% das amostras de milho e derivados, em níveis que variaram entre n.d. e 1569 µg kg⁻¹ para a FB₁ e entre n.d. e 457 µg kg⁻¹ para a FB₂. Na matriz broa, em 25 amostras positivas, as FBs variaram entre n.d. e 550 µg kg⁻¹. Das 41 amostras adquiridas na cidade de Valência, Espanha, 7 apresentaram-se contaminadas em níveis que oscilaram entre n.d. e 922 µg kg⁻¹ para a FB₁ e entre n.d. e 640 µg kg⁻¹ para a FB₂. No total de amostras analisadas, 2 de farinha de

milho, adquiridas em Portugal e em Espanha, respectivamente, excederam o limite estabelecido pela Comissão Europeia de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$. Nenhuma das amostras estudadas excedeu a TDI.

No Capítulo IV apresentam-se os resultados comparativos de dois estudos em que se aplicaram dois procedimentos de derivatização distintos para a análise de FBs em amostras de urina humana. Os métodos analíticos estudados envolveram diluição da amostra com PBS e purificação com IAC. Foram estudados dois reagentes de derivatização, NDA e ortoftaldeído (OPA), usando derivatização pré e pós-coluna, respectivamente. A separação e identificação foram realizadas por LC-FD.

A derivatização pré-coluna não permitiu uma adequada separação da FB_1 dos interferentes presentes na amostra, resultando em recuperações insuficientes para esta. A derivatização pós-coluna, permitiu melhores resultados, no entanto, um melhor conhecimento dos processos químicos envolvidos é essencial para o desenvolvimento de procedimentos mais precisos.

Para a avaliação da ocorrência de FB_1 e FB_2 em 68 amostras de urina humana obtidas em duas populações da zona Centro de Portugal, uma urbana e outra rural, aplicou-se uma metodologia de LC-MS-MS. Esta metodologia, provou ser sensível, exacta e precisa. No entanto, em nenhuma amostra foi detectada a presença de FBs.

Por fim, no Capítulo V apresenta-se a optimização da metodologia analítica realizada para a determinação da razão Sa/So em urina humana, que posteriormente foi aplicada às amostras estudadas no Capítulo IV.

Para detecção e quantificação das bases esfingóides recorreu-se à LC-FD após derivatização com NDA. A tentativa inicial de proceder à purificação das amostras com colunas SPE Oasis HLB, não produziu resultados satisfatórios. No entanto, a aplicação de uma metodologia baseada no isolamento de células esfoliadas da urina e extracção com acetato de etilo permitiu sensibilidade, exactidão e precisão adequadas.

A aplicação deste procedimento demonstrou que, no que respeita à população rural, o rácio Sa/So apresentou uma média de $0,48 \pm 0,22$ para o género

feminino e $0,30 \pm 0,16$ para o género masculino. Relativamente à população urbana, a média do rácio nas amostras femininas foi de $0,44 \pm 0,18$ e $0,29$ na única amostra masculina onde foi possível estabelecer esta proporção. A análise estatística permitiu verificar não existirem diferenças significativas entre as populações estudadas.

ABSTRACT

Fumonisin (FBs) are mycotoxins produced by *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) and *F. proliferatum*, both species are isolated from maize. Fumonisin B₁ (FB₁), followed by B₂ (FB₂) is more abundant and toxic, occurring worldwide.

FBs mode of action respects to its interference with sphingolipid metabolism, being able to change the concentration and proportion of the sphingoid bases – sphinganine (Sa) and sphingosine (So). In humans, the consumption of contaminated foods has been epidemiologically associated with esophageal cancer. FB₁ has been classified as possible carcinogenic for humans (group 2B).

A harmonized legislation does not exist to regulate the allowed maximum levels of FBs in maize and derivatives. In 2006 (EC N.º 1881/2006), European Commission established maximum levels for the sum of FB₁ and FB₂ that in 2007 (EC N.º 1126/2007), for some foods, were increased twice. The same Commission established a tolerable daily intake (TDI) of 2 µg kg⁻¹ body weight day⁻¹ for FB₁ and FB₂ (EC N.º 856/2005).

The exposure evaluation of different populations to FBs is of primordial interest for public health maintenance. This might be accomplished by calculating the estimated daily intake or through the determination of biomarkers as free FBs and the Sa/So ratio in biological samples.

The present dissertation is organized in two parts. In the Theoretical Part, written in Portuguese, and subdivided in Chapters I and II, is presented a review on FBs, respective biomarkers, and analytical methodologies for their determination. In the Experimental Part, subdivided in Chapter III, written

in Portuguese, and in Chapters IV and V, both written in English, are presented the studies on the determination of FBs in maize and maize-based foods, and the determination of free FBs and the Sa/So ratio in human urine, respectively.

Chapter I refers to aspects related to general FBs characteristics, such as producer fungi, physic and chemical characterization, mode of action, biological effects, interactions with other mycotoxins, presence in foods, decontamination processes and, finally, legislation. This chapter also reviews the analytical methods used in the determination of these fungal toxins in foods.

Chapter II aims to review the utility and validity of the application of biomarkers, the free FBs and the Sa/So ratio, to several biological samples. Moreover, the methodologies used for these biomarkers determination in different biological samples are also referred.

In Chapter III, with the goal of determining FB₁ and FB₂ in maize and maize-based foods intended for human consumption, two procedures are compared in what concerns extraction and derivatisation procedures. The optimized method consisted of extraction with methanol:water, clean-up with immunoaffinity columns (IAC) and derivatisation with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA). For separation and identification liquid chromatography (LC) with fluorescence detection (FD), mass detection (MS), and mass-mass detection (MS-MS) were used. Although, tandem mass spectrometry provided higher sensitivity and precision, all the detectors allowed accuracy and precision results in accordance with the European legislation.

Sixty-seven samples of maize and maize-based products and 30 samples of *broa*, collected in the central zone of Portugal, were evaluated. The presence of FBs was observed in 22.4%, in contamination levels ranging between n.d. and 1569 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for FB₁, and between n.d. and 457 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for FB₂. In *broa*, in 25 positive samples, FBs ranged between n.d. and 550 $\mu\text{g kg}^{-1}$. From the 41 samples collected from Valencia markets, Spain, 7 were contaminated with levels ranging from n.d. to 922 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of FB₁ and n.d. to 640 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of FB₂. For all of the analyzed samples, only two of maize flour, collected in Portugal

and Spain, respectively, exceeded the actual maximum level for the sum of FB₁ and FB₂, 1000 µg kg⁻¹ established for maize products. None of the studied samples exceeded the TDI.

Chapter IV shows the results of comparative studies using two different derivatisation procedures for the analysis of FBs in human urine samples. The studied analytical methods involved sample dilution with PBS, and clean-up through IAC. Two derivatizing reagents, NDA and orto-phthaldialdehyde (OPA), were studied, using pre and postcolumn derivatisation, respectively. Separation and identification were carried out by LC-FD.

The precolumn derivatisation did not allow an adequate separation of FB₁ from interferences of urine matrix, resulting in low recoveries for this fumonisin. To accomplish better results, LC-FD detection with postcolumn derivatisation was evaluated. Although separation and recoveries were improved, better knowledge of the chemical processes involved seems essential for development of a more precise determination.

To provide data on natural occurrence of FB₁ and FB₂ in 68 human urine samples, obtained from two populations, one urban and one rural, from the central zone of Portugal, LC-MS-MS was applied. This methodology proved to be sensitive, accurate, and precise. However, in none of the samples detectable levels of FB₁ and FB₂ were found.

Finally, Chapter V presents the optimization of the analytical methodology for the determination of the Sa/So ratio in human urine, that was applied to the samples studied in Chapter IV.

For detection and quantification of the sphingoid bases LC-FD was used after derivatisation with NDA. The initial attempt to clean-up samples with SPE Oasis HLB columns did not produce adequate results. Nonetheless, the application of a methodology based on the isolation of exfoliated cells from urine, followed by extraction with ethyl acetate, allowed adequate sensitivity, accuracy, and precision.

The application of this analytical procedure demonstrated that, regarding the rural population, the Sa/So ratio presented mean levels of 0.48±0.22 for

Abstract

females, and 0.30 ± 0.16 for males. Concerning the urban population, the Sa/So ratio presented a mean of 0.44 ± 0.18 for females, and was 0.29 in the only male sample where its establishment was possible. After the statistical analysis of the data it was observed that no significant differences were found between the studied populations.

OBJECTIVOS

Os objectivos deste trabalho consistiram na avaliação de quatro fases:

- 1.^a Fase – Avaliação dos níveis de fumonisinas B₁ e B₂ em amostras de milho e de alimentos à base de milho;
- 2.^a Fase – Avaliação dos teores de fumonisinas B₁ e B₂ em amostras de urina de homens e mulheres saudáveis habitando em zonas urbanas e em zonas rurais;
- 3.^a Fase – Estudo dos teores de esfinganina e esfingosina e da respectiva razão nas amostras de urina anteriormente mencionadas;
- 4.^a Fase – Análise estatística dos níveis de esfinganina e esfingosina e respectiva razão na urina dos diferentes grupos populacionais estudados nas fases 2 e 3.

Deste modo, o primeiro objectivo consistiu na avaliação dos teores de fumonisinas B₁ e B₂ em milho e alimentos à base de milho destinados à alimentação humana, com a finalidade de verificar se os limites máximos e a ingestão diária tolerável são excedidos.

Para dar cumprimento ao segundo e terceiro, procedeu-se à avaliação dos teores de fumonisinas B₁ e B₂, bem como dos teores de esfinganina e esfingosina e do respectivo rácio em amostras de urina de indivíduos saudáveis, habitando em zonas urbanas e rurais.

A comparação dos dados obtidos com estudos realizados em outros países da Europa e de outros continentes assumiu um papel relevante para este trabalho.

Na quantificação dos diversos compostos nas diferentes matrizes estudadas recorreu-se à cromatografia líquida com detecção espectrofluorimétrica, precedida de diferentes procedimentos extractivos e de purificação. De modo a confirmar a presença de fumonisina B₁ e de fumonisina B₂ recorreu-se à cromatografia líquida com detecção por massa. Foi também aplicada a técnica de cromatografia líquida com detecção por massa em *tandem*.

GOALS

This work aimed to evaluate four points:

- 1st stage – Evaluation of the fumonisins B₁ and B₂ levels in maize and maize-based food samples;
- 2nd stage – Evaluation of the levels of fumonisins B₁ and B₂ in human urine samples from healthy males and females living in rural and urban zones;
- 3rd stage – Study of the sphinganine and sphingosine levels, and respective ratio in the above mentioned urine samples;
- 4th stage – Statistical analysis of the sphinganine, sphingosine, and the sphinganine-sphingosine ratio in the above mentioned population groups, studied in stage 2 and 3.

In this way, the first goal was to evaluate the levels of fumonisins B₁ and B₂ in maize, and maize-based foods intended for human consumption in order to verify if the maximum limits, and the tolerable daily intake were exceeded.

The second and third goals were to evaluate the levels of fumonisins B₁ and B₂, as well as the sphinganine and sphingosine levels, and respective ratio in urine samples from healthy individuals from a rural and an urban population.

Moreover, the comparison between the obtained data and studies from other countries in Europe and other continents was a relevant issue for this work.

For the determination and quantification of the different compounds in the various matrixes studied liquid chromatography with spectrofluorimetric

Goals

detection was applied, preceded by different extraction and clean-up procedures. To confirm the presence of FB₁ and FB₂, liquid chromatography with mass detection was used. Liquid chromatography with tandem mass detection was also applied.

TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO DECURSO DA PREPARAÇÃO DESTA DISSERTAÇÃO

Publicações em artigo

- 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*, 99 (552), 181-192, 2004.
- SILVA L. J. G., LINO C. M., PENA A. S., SILVEIRA M. I. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in maize for human consumption – optimization of HPLC conditions and extraction procedures. Proceedings IntradFood 2005. Innovations in Traditional Foods, Ed. Pedro Fito and Fidal Toldrá, Elsevier, London, 2005 Vol. I, 395-398.
- LINO C. M., SILVA L. J. G., PENA A. S. Metodologias analíticas para a determinação das fumonisinas em milho e alimentos à base de milho. *Química Nova*, 29 (2), 293-299, 2006.
- LINO C. M., SILVA L. J. G., PENA A. S., SILVEIRA M. I. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in Portuguese maize and maize-based samples by HPLC with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 1214-1220, 2006.
- SILVA L. J. G., LINO C. M., PENA A. S., MOLTÓ J. C. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in Portuguese maize and maize-based foods intended for human consumption. *Food Additives Contaminants*, 24(4), 381-390, 2007.
- SILVA L. J. G., JUAN C., LINO C. M., PENA A., MAÑES J. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ and ochratoxin A in broa. Actas do 8.º Encontro Química dos Alimentos. Ed. Silvina Palma Ferro, João Canadá, João Dias, Sandra Palma Ferro, Nuno Bartolomeu Alvarenga, Inst. Pol. Beja/ Esc. Sup. Agr. Beja/SPQ ISBN 978-972-95296-4-1 (E.S.A.B.)/ISBN 978-972-99080-9-5 (S. P. Q.) 2007, 259-263.

- SILVA L. J. G., FERNÁNDEZ M., LINO C. M., PENA A. S., MAÑES J. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in *broa*, typical portuguese maize bread. *International Journal of Food Microbiology* 118 (1), 79-82, 2007.
- LINO C. M., SILVA L. J. G., PENA A. Metodologias analíticas para a determinação de biomarcadores de fumonisinas em amostras biológicas. *Química* 106, 45-52, 2007.
- LINO C. M., SILVA L. J. G., PENA A. Exposição às fumonisinas: biomarcadores. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. Aceite para publicação.
- SILVA L. J. G., FERNÁNDEZ-FRANZÓN M., FONT G., PENA A., SILVEIRA I., LINO C., MAÑES J. Analysis of fumonisins in corn-based food by liquid-chromatography with fluorescence and mass spectrometry detectors. *Food Chemistry*. Aceite para publicação (DOI:10.1016/j.foodchem.2008.06.080).
- PENA A., SILVA L. J. G., LINO C. M. Liquid chromatographic determination of FB₁ and FB₂ in human urine using pre and postcolumn derivatisation. Submetido.

Publicações em resumo

- LINO C. M., SILVA L. J. G., PENA A. S., MOLTÓ J. C. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in cornflakes, mixed cereals, and maize snacks. *Revista Portuguesa de Farmácia*, Vol. LII (3) Supl., 61, 2006.
- LINO C. M., SILVA L. J. G., PENA A., SORIANO J. M. Quantification of NDA-derivatives of fumonisins B₁ and B₂ in maize and maize-based foods by HPLC-FD. *Luminescence*, 21, 335-336, 2006.
- LINO C. M., SILVA L. J. G., PENA A., FERNÁNDEZ M. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in *broa* by liquid chromatography with fluorescence detection. *Luminescence*, 21, 337, 2006.

Comunicações Orais

- L. J. G. SILVA, C. JUAN, C. M. LINO, A. PENA, J. MAÑES. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ and ochratoxin A in *broa*. 8.º Encontro Química dos Alimentos. Instituto Politécnico Beja, Beja, 3-6 Março 2007.

Comunicações em painel

- L. J. G. SILVA, C. M. LINO, A. S. PENA, M. I. SILVEIRA. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in maize for human consumption – optimization of HPLC conditions and extraction procedures. Abstracts of Congress INTRADFOOD 2005 – Innovations in Traditional Foods. P2.66. Valência, 25-28 October 2005, Ed. Pedro Fito; Fidel Toldrá, Elsevier 2005.
- C. M. LINO, L. J. G. SILVA, A. S. PENA, J. C. MOLTÓ. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in cornflakes, mixed cereals, and maize snacks. I Encontro Nacional de Bromatologia, Hidrologia e Toxicologia. p. 61. PB26. OF, Sesimbra, 2-3 Junho 2006.
- C. M. LINO, L. J. G. SILVA, A. S. PENA, J. M. SORIANO. Quantification of NDA-derivatives of fumonisins B₁ and B₂ in maize and maize-based foods by HPLC-FD. XIIth International Symposium on Luminescence Spectrometry Detection Techniques in Biomedical, Environmental and Food Analysis. p.66, PO45, Lugo, 18-21 July 2006.
- C. M. LINO, L. J. G. SILVA, A. S. PENA, M. FERNÁNDEZ. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in *broa* by liquid chromatography with fluorescence detection. XIIth International Symposium on Luminescence Spectrometry Detection Techniques in Biomedical, Environmental and Food Analysis. p.67, PO46, Lugo, 18-21 July 2006.
- M. FERNÁNDEZ, L. J. G. SILVA, J. C. MOLTÓ, A. PENA, C. M. LINO, J. MAÑES. Comparison of LC-FD with LC-MS and LC-MS-MS for fumonisins and determination in corn-based food. VI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques. p. 113, P8.Vigo, 8-10 November, 2006.
- L. J. G. SILVA, C. M. LINO, A. PENA, J. MAÑES. Fumonisins surveillance in maize based foods from the central zone of Portugal and Valencian Community, Spain: 2005-2006. Congresso Nacional dos Farmacêuticos. p. 169, abht-3, Lisboa, 8-10 Março 2007.
- L. J. G. SILVA, A. PENA, C. M. LINO. Ochratoxin A and Fumonisins B₁ and B₂ surveillance in foodstuffs from the central zone of Portugal. XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Abstract No 1431, Istanbul, 21-25 May 2007.

- A. PENA, L. J. G. SILVA, C. M. LINO. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in human urine using pre and postcolumn derivatisation. 5.º Encontro Nacional de Cromatografia, Sociedade Portuguesa de Química. p. 249, P.85, Universidade de Aveiro, Aveiro, 10-12 Dezembro 2007.
- L. J. G. SILVA, C. M. LINO, A. PENA. Determination of the Sa/So ratio in human urine – optimization of HPLC conditions and extraction procedures. AOAC Europe Section International Workshop and II Encontro Nacional de Bromatologia, Hidrologia e Toxicologia. p.100. 5GAM. OF, Lisboa, 17-18 Abril 2008.
- L. J. G. SILVA, A. PENA, C. M. LINO, M. FERNANDÉZ. Absence of fumonisins B₁ and B₂ in urine from two Portuguese human populations. First European Food Congress, EFFoST, Ljubljana, Slovenia, 4-9 November 2008. Aceite para publicação.
- L. J. G. SILVA, C. M. LINO, A. PENA. The Sa/So ratio in urine from two Portuguese human populations as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. First European Food Congress, EFFoST, Ljubljana, Slovenia, 4-9 November 2008. Aceite para publicação.

Conferências

- SILVA L. J. G. Fumonisina B₁ e B₂ em alimentos: optimização de metodologias analíticas e níveis de contaminação na zona Centro de Portugal. Ciclo de Seminários de Pós-Graduação – CEF. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 13 Dezembro 2006.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	XIII
ABREVIATURAS	XV
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XXIII
OBJECTIVOS	XXVII
GOALS	XXIX
TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO DECURSO DA PREPARAÇÃO DESTA DISSERTAÇÃO	XXXI
ÍNDICE GERAL	XXXV
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	XLI
PARTE TEÓRICA	1
CAPÍTULO I – FUMONISINAS E METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A SUA DETERMINAÇÃO EM ALIMENTOS	3
I.1. Fumonisinas	5
I.1.1. Fungos produtores	5
I.1.2. Características físico-químicas	7
I.1.3. Mecanismo de acção	9
I.1.4. Efeitos biológicos	11
I.1.4.1. Animais	12
I.1.4.2. Homem	13
I.1.5. Interação com outras micotoxinas	14
I.1.6. Presença em alimentos e avaliação da exposição	16
I.1.6.1. Alimentos destinados ao consumo animal	17
I.1.6.2. Alimentos destinados ao consumo humano	18
I.1.6.3. Ingestão diária estimada vs ingestão diária tolerável ..	21
I.1.7. Processos de descontaminação	22
I.1.7.1. Físicos	23
I.1.7.2. Químicos	24
I.1.7.3. Biológicos	26
I.1.8. Legislação	27

I.2. Metodologias analíticas para a determinação de fumonisinas em alimentos	31
I.2.1. Extração	32
I.2.2. Purificação	35
I.2.3. Derivatização	37
I.2.4. Detecção e quantificação	40
I.2.4.1. Métodos cromatográficos	40
I.2.4.1.1. Cromatografia líquida	40
I.2.4.1.2. Cromatografia em camada fina	45
I.2.4.1.3. Cromatografia gasosa	46
I.2.4.2. Outros métodos	47
I.2.4.2.1. Imunológicos	47
I.2.4.2.2. Electroforéticos	48
I.2.5. Confirmação	49
CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO ÀS FUMONISINAS: BIOMARCADORES E METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A SUA DETERMINAÇÃO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	51
II.1. Fumonisinas	55
II.1.1. Fluidos biológicos e fezes	56
II.1.2. Tecidos	60
II.2. Razão esfinganina/esfingosina (Sa/So)	62
II.2.1. Fluidos biológicos	65
II.2.2. Tecidos	73
II.3. Metodologias analíticas para a determinação de fumonisinas em amostras biológicas	74
II.3.1. Extração	74
II.3.2. Purificação	75
II.3.3. Derivatização	76
II.3.4. Detecção e quantificação	77
II.3.4.1. Cromatografia líquida	77
II.3.4.2. Cromatografia em camada fina	80
II.3.4.3. Métodos radioactivos	80
II.3.4.4. Métodos imuno-histoquímicos – sistema avidina-biotina-peroxidase	81

II.4. Metodologias analíticas para a determinação da proporção esfinganina/esfingosina em amostras biológicas	81
II.4.1. Extracção	82
II.4.2. Purificação	83
II.4.3. Derivatização	84
II.4.4. Detecção e quantificação	86
II.4.4.1. Cromatografia líquida	86
II.4.4.2. Cromatografia em camada fina e métodos radio-activos	88
PARTE EXPERIMENTAL	91
CAPÍTULO III – DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS B ₁ E B ₂ EM MILHO E ALIMENTOS À BASE DE MILHO DESTINADOS AO CONSUMO HUMANO	93
III.1. Introdução	95
III.2. Amostragem	98
III.3. Materiais e métodos	99
III.3.1. Reagentes químicos e soluções padrão	99
III.3.2. Materiais e equipamento	101
III.3.3. Ensaio de fortificação	102
III.3.4. Extracção e purificação	103
III.3.4.1. Método A	103
III.3.4.2. Método B	103
III.3.5. Derivatização	103
III.3.6. Cromatografia líquida com detecção por fluorescência	104
III.3.7. Cromatografia líquida com ionização por <i>electrospray</i> e detecção por massa	104
III.3.8. Cromatografia líquida com ionização por <i>electrospray</i> e detecção por massa-massa	105
III.4. Resultados e discussão	106
III.4.1. Optimização da metodologia analítica	106
III.4.1.1. Extracção e purificação	106
III.4.1.2. Cromatografia líquida com detecção por fluorescência	107
III.4.1.3. Cromatografia líquida com detecção por massa	112
III.4.1.4. Cromatografia líquida com detecção por massa-massa	115

III.4.1.5. Comparação entre LC-FD, LC-MS e LC-MS-MS	120
III.4.2. Ocorrência de FBs nas amostras analisadas	122
III.4.2.1. Milho e alimentos derivados	122
III.4.2.2. Broa	133
III.4.2.3. Ingestão diária estimada	138
III.5. Conclusões	142
CAPÍTULO IV – DETERMINATION OF FUMONISINS B₁ AND B₂ IN HUMAN URINE	145
IV.1. Introduction	147
IV.2. Sampling	152
IV.3. Materials and methods	152
IV.3.1. Chemical reagents and standard solutions	152
IV.3.2. Materials and equipment	154
IV.3.3. Recovery assays	155
IV.3.4. Extraction and clean-up	156
IV.3.5. Liquid chromatography with fluorescence detection: pre-column derivatisation	156
IV.3.6. Liquid chromatography with fluorescence detection: post-column derivatisation	156
IV.3.7. Liquid chromatography with mass-mass detection	157
IV.4. Results and discussion	158
IV.4.1. Extraction and clean-up	158
IV.4.2. Liquid chromatography with fluorescence detection: pre-column derivatisation	159
IV.4.3. Liquid chromatography with fluorescence detection: post-column derivatisation	162
IV.4.4. Liquid chromatography with mass-mass detection	164
IV.5. Conclusions	169
CAPÍTULO V – DETERMINATION OF THE RATIO SPHINGANINE/SPHINGOSINE IN HUMAN URINE	171
V.1. Introduction	173
V.2. Sampling	175
V.3. Materials and methods	175
V.3.1. Chemicals reagents and standard solutions	175
V.3.2. Materials and equipment	176
V.3.3. Recovery assays	177

V.3.4. Extraction	177
V.3.5. Liquid chromatography with fluorescence detection	177
V.3.6. Statistical analysis	178
V.4. Results and discussion	178
V.4.1. Optimization of liquid chromatography conditions and extraction procedures	178
V.4.1.1. Optimization of liquid chromatography conditions	178
V.4.1.2. Optimization of extraction procedures	181
V.4.2. Application to real samples	186
V.5. Conclusions	193
CONCLUSÕES GERAIS	195
GENERAL CONCLUSIONS	201
BIBLIOGRAFIA	207

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA I.1	<i>Fusarium</i> – <i>Fusarium verticillioides</i> (A) e <i>F. proliferatum</i> (B), sobretudo isolados no milho	7
FIGURA I.2	Fórmula estrutural das fumonisinas B ₁ -B ₄ (adaptado de Fumonisins: http://micotoxinas.com.br/fumofacts.htm). FB ₁ : R1=OH; R2=OH; R3=OH; FB ₂ : R1=OH; R2=OH; R3=H; FB ₃ : R1=H; R2=OH; R3= H; FB ₄ : R1=H; R2=OH; R3=H	8
FIGURA I.3	Modo de acção das fumonisinas (o símbolo × significa bloqueio da reacção)	11
FIGURA I.4	Esquema representativo da purificação com colunas de imunoafinidade	37
FIGURA I.5	Estruturas químicas dos reagentes de derivatização mais usados na análise de FBs	39
FIGURA II.1	Mecanismo da biossíntese <i>de novo</i> dos esfingolípidos em células animais (o símbolo × significa bloqueio da reacção; adaptado de Soriano <i>et al.</i> , 2005)	63
FIGURA II.2	Estrutura química da esfinganina, esfingosina e fumonisina B ₁ (adaptado de Solfrizzo <i>et al.</i> , 1997)	64
FIGURA II.3	Reacção de derivatização com OPA (A: OPA; B: FBs; C: MCE; D: derivado FBs-OPA)	76
FIGURA II.4	Reacção de derivatização da So com NDA (A: So; B: NDA; C: derivado So-NDA)	85
FIGURA III.1	Esquematisação da produção tradicional de broa	96
FIGURA III.2	Amostragem de milho, alimentos derivados e broa comercialmente adquirida em Coimbra, Portugal, durante 2005	98
FIGURA III.3	Amostragem de alimentos derivados de milho comercialmente adquirida em Valência, Espanha, durante 2006	99
FIGURA III.4	Linearidade da FB ₁ (A) e FB ₂ (B) obtida por LC-FD avaliada entre 0,52 ng e 10,4 ng injectados	109

FIGURA III.5 Cromatogramas de LC-FD de A: um padrão 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fumonisina B ₁ e B ₂ (tempo de retenção 7,36 e 13,34 min para a FB ₁ e FB ₂ , respectivamente); B: uma amostra fortificada com 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB ₁ e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB ₂ ; C: uma amostra contaminada com 441 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB ₁ e 237 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB ₂ , obtidos usando a metodologia otimizada.....	110
FIGURA III.6 Cromatograma LC-MS de A: padrão de 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FB ₁ e FB ₂ ; B: amostra contaminada de farinha com 922 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB ₁ e 644 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB ₂ (tempo de retenção 6,87 e 12,22 min para a FB ₁ e FB ₂ , respectivamente)	114
FIGURA III.7 Linearidade da FB ₁ (A) e FB ₂ (B) obtida por LC-ESI-MS avaliada entre 1 ng e 250 ng injectados	114
FIGURA III.8 Espectro dos iões produto da FB ₁ (A) e FB ₂ (B) obtidos com QqQ	116
FIGURA III.9 Cromatograma QqQ MRM de uma amostra orgânica de farinha de milho contaminada com 258 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB ₁ (A) e 156 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB ₂ (B)	118
FIGURA III.10 Linearidade da FB ₁ (A) e FB ₂ (B) obtida por LC-ESI-MS-MS avaliada entre 0,25 ng e 100 ng injectados	119
FIGURA III.11 Gráfico representativo dos níveis médios de contaminação de FB ₁ e FB ₂ em milho e em produtos à base de milho em Portugal	124
FIGURA III.12 Gráfico representativo dos níveis médios de contaminação de FBs em milho e em produtos à base de milho em Espanha	133
FIGURA III.13 Níveis médios ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e incidência (n=30) de FBs em broa em Portugal	134
FIGURA III.14 EDI para a FB ₁ <i>versus</i> TDI nas diversas matrizes de milho e derivados estudadas em Portugal	140
FIGURE IV.1 Schematic diagram of precolumn derivatisation reaction with OPA-MCE: (A) OPA; (B) FBs; (C) MCE; (D) fluorescent derivative	149
FIGURE IV.2 Schematic diagram of precolumn derivatisation reaction with NDA-KCN: (A) fumonisin; (B) NDA; (C) cyanide ion; (D) fluorescent derivative	150
FIGURE IV.3 Schematic diagram of postcolumn derivatisation reaction with OPA-NAC: (A) OPA; (B) fumonisin; (C) NAC; (D) fluorescent derivative	151

FIGURE IV.4 Schematic diagram of the LC system with postcolumn derivatisation: a) mobile phase; b) pump 1; c) analytical column; d) reaction solution OPA-NAC; e) pump 2; f) reaction box; g) reaction coil; h) thermostatic bath; i) spectrofluorimeter; j) integrator; k) waste	155
FIGURE IV.5 Liquid chromatography with NDA precolumn derivatisation chromatogram of a standard solution	161
FIGURE IV.6 Liquid chromatography with OPA postcolumn derivatisation chromatogram of a standard solution (A) and a fortification (B)	163
FIGURE IV.7 FB ₁ (A) and FB ₂ (B) linearity evaluated between 1 ng and 200 ng injected	165
FIGURE IV.8 LC-ESI-MS-MS chromatograms of FB ₁ (A) and FB ₂ (B) standard solution at 1 µg mL ⁻¹ (mean retention time of 7.5 and 13.85 min for FB ₁ and FB ₂ , respectively).....	166
FIGURE IV.9 LC-ESI-MS-MS chromatograms of a spiked sample at 100 ng mL ⁻¹ for both FB ₁ (A) and FB ₂ (B)	167
FIGURE V.1 Sa linearity (A) and So linearity (B) evaluated between 0.03 ng and 1.25 ng injected	179
FIGURE V.2 LC-FD chromatograms of A: Sa and So standard solution at 125 ng mL ⁻¹ (mean retention time of 13.32 and 16.54 min for So and Sa, respectively); B: a spiked sample at 3 ng mL ⁻¹ for each sphingoid base; C: a female sample with 3.62 ng mL ⁻¹ and 9.45 ng mL ⁻¹ of Sa and So, respectively; and D: a male sample with 0.18 ng mL ⁻¹ and 0.63 ng mL ⁻¹ of Sa and So, respectively	180
FIGURE V.3 Sa, So and Sa/So means for rural and urban population	187
TABELA I.1 Principais micotoxinas e respectivos fungos produtores (adaptado de D'Mello e Macdonald, 1997)	6
TABELA I.2 Níveis médios de FBs em alimentos compostos associados à ELEM	17
TABELA I.3 Níveis de FBs em alimentos destinados ao consumo humano de diferentes países	19
TABELA I.4 Níveis máximos de FBs permitidos em diferentes países, em milho e alimentos derivados	31
TABELA I.5 Processos de extracção e purificação aplicados à análise de FBs em alimentos	33

TABELA I.6	Solventes utilizados na fase móvel	42
TABELA I.7	Fluxos utilizados no sistema de LC	43
TABELA I.8	Reagentes derivatizantes/ comprimentos de onda usados (nm)	44
TABELA II.1	Valores da razão Sa/So observados em estudos realizados em animais	66
TABELA II.2	Valores da razão Sa/So observados em estudos realizados em humanos	72
TABELA II.3	Condições cromatográficas por LC para a determinação de FBs em amostras biológicas	79
TABELA II.4	Condições cromatográficas por LC para a determinação de bases esfingóides em amostras biológicas	87
TABELA III.1	Comparação de diferentes condições cromatográficas aquando da utilização do OPA (λ exc=335 nm e λ em=440 nm)	107
TABELA III.2	Comparação de diferentes condições cromatográficas com NDA (λ exc=420 nm e λ em=500 nm)	108
TABELA III.3	Estabilidade dos derivados fluorescentes do NDA expressa em ng e em percentagem, ng (%)	109
TABELA III.4	Exactidão e resultados de validação intra-dia (n=3) e inter-dia (n=9) obtidos com o método otimizado para LC-FD para a matriz amido de milho	111
TABELA III.5	Exactidão e resultados de validação intra-dia (n=3) e inter-dia (n=9) obtidos com o método otimizado para LC-FD para a matriz broa	112
TABELA III.6	Comparação dos modos de ião positivo (PI) e negativo (NI) na interface ESI em quadrupolo simples	113
TABELA III.7	Exactidão e resultados de validação intra-dia (n=3) e inter-dia (n=9) obtidos com o método otimizado para LC-ESI-MS para a matriz amido de milho	115
TABELA III.8	Iões estudados, voltagens de cone e energias de colisão usadas em LC-MS-MS	117
TABELA III.9	Exactidão e resultados de validação intra-dia (n=3) e inter-dia (n=9) obtidos com o método otimizado para LC-ESI-MS-MS para a matriz amido de milho	119
TABELA III.10	Dados relativos às curvas de calibração obtidas com as diferentes técnicas	121
TABELA III.11	Limites de detecção (LODs) e quantificação (LOQs) e exactidão obtidos para a FB ₁ e FB ₂ por cromatografia líquida usando os detectores de FD, MS e MS-MS	122

TABELA III.12	Prevalência e níveis de FBs em milho e produtos derivados adquiridos em Portugal	123
TABELA III.13	Ocorrência de FBs em milho e produtos derivados	125
TABELA III.14	Prevalência e níveis de FBs em milho e produtos derivados adquiridos em Espanha	132
TABELA III.15	Prevalência e níveis de FBs em broa de Portugal	134
TABELA III.16	Ingestões diárias estimadas (EDIs) de FBs encontradas nas diferentes matrizes estudadas em Portugal	139
TABELA III.17	Ingestões diárias estimadas (EDIs) de FBs encontradas nas diferentes matrizes estudadas em Espanha	141
TABLE IV.1	Accuracy and intra-assay validation results (n=3) and inter-assay (n=9) with the LC-ESI-MS-MS method	168
TABLE V.1	Optimization of the clean-up Oasis procedure for Sa and So standard solutions	183
TABLE V.2	Accuracy and intra-assay validation results (n=3) and inter-assay (n=9) with the optimized method	185
TABLE V.3	Frequency (%), range, mean concentration, standard deviation (ng mL ⁻¹), and <i>p</i> value of Sa, So and Sa/So in the studied rural and urban populations	187
TABLE V.4	Sa/So ratio obtained in our study as well as in different studies accomplished in urine samples from humans	189

PARTE TEÓRICA

CAPÍTULO I – FUMONISINAS E METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A SUA DETERMINAÇÃO EM ALIMENTOS

I.1. Fumonisinas

I.1.1. Fungos produtores

I.1.2. Características físico-químicas

I.1.3. Mecanismo de acção

I.1.4. Efeitos biológicos

I.1.4.1. Animais

I.1.4.2. Homem

I.1.5. Interação com outras micotoxinas

I.1.6. Presença em alimentos e avaliação da exposição

I.1.6.1. Alimentos destinados ao consumo animal

I.1.6.2. Alimentos destinados ao consumo humano

I.1.6.3. Ingestão diária estimada vs ingestão diária tolerável

I.1.7. Processos de descontaminação

I.1.7.1. Físicos

I.1.7.2. Químicos

I.1.7.3. Biológicos

I.1.8. Legislação

I.2. Metodologias analíticas para a determinação de fumonisinas em alimentos

I.2.1. Extração

I.2.2. Purificação

I.2.3. Derivatização

I.2.4. Detecção e quantificação

I.2.4.1. Métodos cromatográficos

I.2.4.1.1. Cromatografia líquida

I.2.4.1.2. Cromatografia em camada fina

I.2.4.1.3. Cromatografia gasosa

I.2.4.2. Outros métodos

I.2.4.2.1. Imunológicos

I.2.4.2.2. Electroforéticos

I.2.5. Confirmação

I.1. FUMONISINAS

I.1.1. FUNGOS PRODUTORES

As micotoxinas, metabolitos fúngicos secundários presentes numa grande parte dos alimentos, além de provocarem grandes perdas económicas para os produtores de cereais e processadores de alimentos, representam um sério risco para a saúde humana e animal. A micoflora está estimada entre 200.000 e 300.000 espécies, tendo sido identificadas mais de 400 micotoxinas (D’Mello e Macdonald, 1997).

A produção mundial anual de cereais excede os 160 kg *per capita*, com tendência para aumentar, mas estima-se que cerca de 10 a 30% dos grãos colhidos se percam por infecções promovidas pelo desenvolvimento de fungos. A FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) estima que, em todo o mundo, cerca de 25% das colheitas de alimentos estão afectadas por micotoxinas (Cirillo *et al.*, 2003a).

Cinco tipos de micotoxinas são considerados económica e toxicologicamente importantes: aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), tricotecenos (desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), T-2 toxina (T-2) e HT-2 toxina (HT-2)), zearalenona (ZEA) e fumonisinas (FBs) (Charmley *et al.*, 1994). Na Tabela I.1 encontram-se as principais micotoxinas e os respectivos fungos produtores.

A ocorrência de micotoxinas produzidas por espécies do género *Fusarium* está geralmente associada a cereais produzidos em países de zonas temperadas já que este fungo, relativamente às espécies de *Aspergillus*, necessita de temperaturas moderadas para o seu desenvolvimento e produção de micotoxinas. No entanto, diversos dados da literatura indicam também uma contaminação

extensa de cereais na região dos trópicos, sobretudo milho, por algumas micotoxinas de *Fusarium*. Do ponto de vista da saúde e produtividade animal e da saúde humana, os tricotecenos, a ZEA e as FBs são as micotoxinas mais importantes sintetizadas pelas espécies deste género (D’Mello e Macdonald, 1997). Os membros pertencentes ao género *Fusarium* são economicamente importantes uma vez que são fungos patogénicos para plantas, causando, todos os anos, vastos prejuízos, nomeadamente em culturas de milho (Jurgenson *et al.*, 2002).

Tabela I.1 Principais micotoxinas e respectivos fungos produtores (adaptado de D’Mello e Macdonald, 1997).

Micotoxinas	Fungos produtores
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>P. cyclopium</i>
Tricotecenos	
Desoxinevalenol	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>
Nivalenol	
T2-toxina	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i>
HT2-toxina	
Zearalenona	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>
Fumonisinias	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>

Acuña *et al.* (2005) estudaram a prevalência de espécies de *Fusarium* em alimentos da Colombia destinados ao consumo animal bem como a sua capacidade para produzir FBs. Concluíram que um total de 41 amostras (71,9%) apresentava *Fusarium* spp.. As matrizes mais contaminadas eram milho, 100%, e soja, 80%. O trigo e o arroz apresentaram níveis mais baixos de contaminação, 40% e 20%, respectivamente, enquanto nas sementes de girassol não foi possível isolar *Fusarium* spp.. As espécies de *Fusarium* mais prevalentes foram *F. verticillioides* ou *F. moniliforme* (70,8%), *F. proliferatum* (25,0%) e *F. subglutinans* (4,2%), todas pertencentes à secção *Liseola*. Quase todas as sub-espécies de *F. verticillioides* (97,1%) produziram fumonisina B₁ (FB₁) em teores compreendidos entre 5,6 e 25846,4 mg kg⁻¹ e fumonisina B₂ (FB₂) entre 3,4 e 7507,5 mg kg⁻¹. De igual modo, 91,7% das sub-espécies de *F. proliferatum*

produziram FBs, mas a níveis inferiores relativamente ao *F. verticillioides*. Esses níveis oscilaram entre 6,9 e 3885,0 mg kg⁻¹ para a FB₁ e entre 34,3 e 373,8 mg kg⁻¹ para a FB₂. *F. subglutinans* não produziu FBs.

A produção de FBs está assim restringida a duas espécies da secção *Liseola* (Thiel *et al.*, 1991), o *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sinónimo de *Fusarium moniliforme* Sheldon, teleomorfo *Giberella moniliformes*, sinónimo *Giberella fujikuroi*) (Woloshuk e Shim, 2001) e o *Fusarium proliferatum* (T. Matsushima) Nirenberg. Ambas as espécies são sobretudo isoladas no milho, sendo a primeira a mais prevalente (Scott e Lawrence, 1995) (Figura I.1).

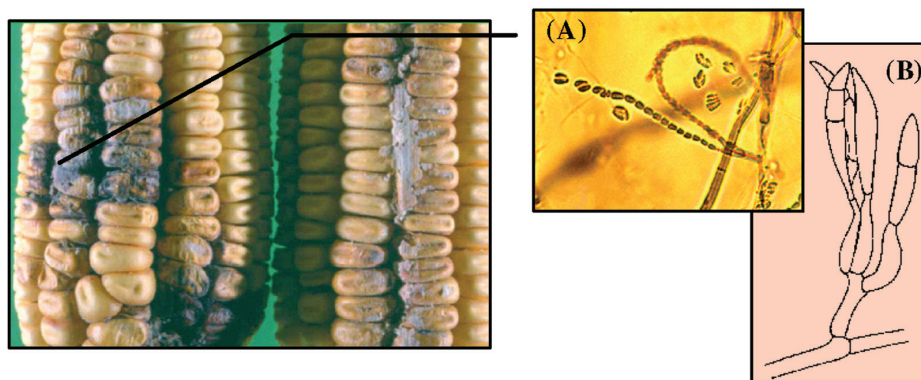


Figura I.1 *Fusarium* – *Fusarium verticillioides* (A) e *F. proliferatum* (B), sobretudo isolados no milho.

I.1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS

As fumonisinas B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂) foram isoladas, pela primeira vez, de culturas de *Fusarium moniliforme* MRC 826 por Gelderblom *et al.*, investigadores do South African Medical Research Council, em 1988 (Gelderblom *et al.*, 1988; Nelson *et al.*, 1993; Shephard *et al.*, 2000; Fumonisin Page). Vinte anos de investigação na possível causa para a elevada incidência de cancro esofágico (EC) na região de Transkei (África do Sul) culminaram com esta descoberta (Nelson *et al.*, 1993).

Mais tarde, ainda em 1988, Bezuidenhout *et al.* elucidaram a estrutura das FB₁ e FB₂. No curto espaço de tempo entre a descoberta destas micotoxinas e a ocorrência de epidemias, como a leucoencefalomalacia dos equídeos (ELEM) e edema pulmonar (PPE) em cavalos e suínos, respectivamente, observou-se uma explosão no seu estudo, bem como no estudo de *Fusarium* spp. (Fumonisin Page).

Existem diferentes séries de FBs, estruturalmente relacionadas: A (A₁-A₄), B (B₁-B₄), C (C₁-C₄) e P (Seo e Lee, 1999). No entanto, a que se encontra em maior abundância é a FB₁, constituindo 70% do total de FBs, seguindo-se a FB₂ e a FB₃ (Labuda *et al.*, 2003), sendo também a FB₁ considerada a mais tóxica.

A FB₁, segundo Bezuidenhout *et al.* (1988), é um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico e 2*S*-amino-12*S*,16*R*-dimetilo-3*S*,5*R*,10*R*,14*S*,15*R*-pentahidroieicoisano, em que os grupos hidroxilos em C₁₄ e C₁₅ estão esterificados com um grupo carboxilo terminal do ácido tricarbóxico (Sydenham *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2003). As FB₂-B₄ apresentam padrões diferentes de hidroxilação (Figura I.2).

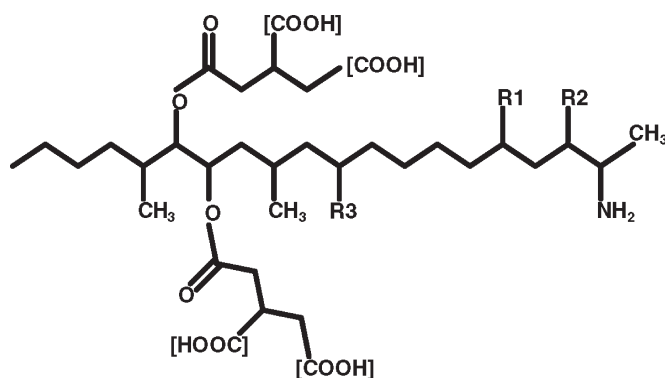


Figura I.2 Fórmula estrutural das fumonisinas B₁-B₄ (adaptado de Fumonisin: <http://micotoxinas.com.br/fumofacts.htm>).

FB₁: R1=OH; R2=OH; R3=OH;
 FB₂: R1=OH; R2=OH; R3=H;
 FB₃: R1=H; R2=OH; R3=OH;
 FB₄: R1=H; R2=OH; R3=H.

A FB₂ não possui o grupo hidroxilo em C₁₀, enquanto que a FB₃ não apresenta o grupo hidroxilo em C₅. Algumas amostras de milho também possuem

FB₄ verificando-se, neste caso, a ausência de grupos hidroxilos em ambos os carbonos (C₅ e C₁₀) (Seo e Lee, 1999).

As fumonisinas da série A são n-acetiladas e ocorrem apenas em pequenas concentrações (Nelson *et al.*, 1993). A série C é quimicamente semelhante à série B, com a excepção de não possuir o grupo metilo terminal em C₁ (Seo e Lee, 1999). A série P apresenta em C₂ um grupo 3-hidroxipiridina a substituir o grupo amina presente nas fumonisinas da série B (Musser e Plattner, 1997).

A ocorrência natural de FA₁, FB₄ e da série C nunca foi referida (Seo e Lee, 1999). Segundo Plattner *et al.* (1992) as fumonisinas da série A podem ser artefactos criados durante o isolamento inicial das fumonisinas.

A quantidade de fumonisinas hidrolisadas (HFBs) e parcialmente hidrolisadas (PHFBs) em milho naturalmente contaminado é bastante inferior relativamente à quantidade de fumonisinas intactas. As HFBs não apresentam os dois grupos de ácido tricarbóxico que nas fumonisinas intactas se encontram esterificados em C₁₄ e C₁₅, enquanto as PHFBs apresentam apenas um grupo de ácido tricarbóxico. Os métodos utilizados nos processos de fabrico de produtos derivados do milho podem converter fumonisinas intactas em fumonisinas hidrolisadas e parcialmente hidrolisadas (Polling e Plattner, 1999).

As FBs são moléculas fortemente polares, solúveis em água, metanol e acetonitrilo e insolúveis em solventes orgânicos (Pozzi *et al.*, 2002) (Subcapítulo I.2.1). Apesar do metanol ser o solvente de eleição da maioria dos autores, estas micotoxinas são mais estáveis em acetonitrilo, normalmente até 6 meses, do que em metanol, usualmente até 6 semanas. Assim, as soluções padrão devem ser preparadas em acetonitrilo e as amostras devem ser dissolvidas em metanol imediatamente antes da respectiva análise (Velázquez *et al.*, 2000).

I.1.3. MECANISMO DE ACÇÃO

Em todas as espécies de animais estudadas verificou-se que a absorção das FBs no tubo digestivo é diminuta, sendo rapidamente eliminadas. O fígado e o

rim são os órgãos que retêm a maior parte das FBs absorvidas (FAO/WHO, 2001; Williams *et al.*, 2003).

O modo de acção das FBs relaciona-se com a sua interferência com o metabolismo da esfingosina – esfinganina (So-Sa) (Cirillo *et al.*, 2003a), perturbando o metabolismo dos esfingolípidos (Turner *et al.*, 1999).

Os esfingolípidos estão presentes nas membranas celulares, desempenhando um papel fundamental na regulação celular e no controlo de proteínas membranares, mediando o crescimento celular, a diferenciação e a morte das células (Turner *et al.*, 1999). Os esfingolípidos mais simples são as bases esfingóides. Nas células dos mamíferos as bases esfingóides mais comuns são a esfingosina (So) e a esfinganina (Sa). Normalmente a concentração de So é três a cinco vezes mais elevada do que a de Sa e a manutenção de baixas concentrações de Sa e So livres é importante uma vez que estes compostos têm uma actividade biológica intrínseca considerável (Riley *et al.*, 1994b).

Em estudos *in vivo* e *in vitro* foi demonstrado que as FBs, com excepção da série A, são potentes inibidores competitivos da esfinganina N-aciltransferase e da esfingosina N-aciltransferase (ceramida sintetase) uma vez que, estruturalmente, são análogas das bases esfingóides. As enzimas anteriormente referidas são elementos chave para a via metabólica da biossíntese dos esfingolípidos *de novo* e *turnover* dos mesmos. Deste modo, as FBs podem alterar a concentração e a proporção entre a Sa e a So, diminuindo a biossíntese de So e acumulando Sa (Riley *et al.*, 1994b; Turner *et al.*, 1999; Desai *et al.*, 2002, Carratù *et al.*, 2003) (Figura I.3).

Podem também bloquear a biossíntese de esfingolípidos complexos em células eucarióticas. Os esfingolípidos complexos desempenham funções muito importantes a nível membranar, estando também na base da formação de mensageiros secundários que controlam diferentes processos celulares, incluindo a expressão genética e a activação/desactivação de proteínas específicas (Riley *et al.*, 1994b). Assim, estas micotoxinas contribuem para uma variedade de consequências a nível celular, como sejam a indução da apoptose e efeitos carcinogénicos (Turner *et al.*, 1999; Momany e Dombrink-Kurtzman, 2001; Desai *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2003).

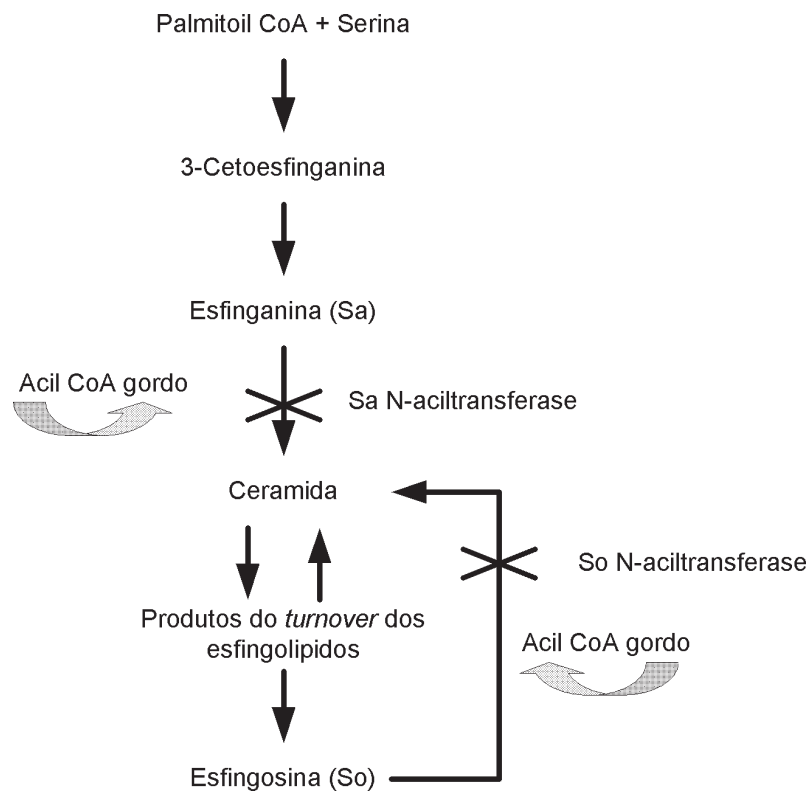


Figura I.3 Modo de ação das fumonisinas (o símbolo X significa bloqueio da reação).

I.1.4. EFEITOS BIOLÓGICOS

A contaminação de alimentos com FBs tem sido associada a doenças várias, quer em animais quer em humanos. As manifestações clínicas que decorrem das toxicoses provocadas pelas FBs, bem como os órgãos atingidos variam de espécie para espécie. Nos cavalos conduzem ao aparecimento de ELEM, em suínos provocam PPE. Em ovelhas, ratos e coelhos induzem a toxicidade renal, sendo também hepatotóxicas para os segundos. Outras espécies também são atingidas por toxicoses provocadas por estas micotoxinas (Ross *et al.*, 1991; Shephard *et al.*, 2000; Voss *et al.*, 2001).

Alguns efeitos anti-nutricionais e alterações fisiopatológicas em ratos adultos estão descritos, nomeadamente a redução da incorporação de folatos (Carratù *et al.*, 2003; Marasas *et al.*, 2004). Também têm sido epidemiologicamente

relacionadas com o cancro esofágico nos humanos (Meyer *et al.*, 2003). Estas micotoxinas são citotóxicas e inibem a síntese proteica e do DNA, promovem stress oxidativo, induzem a fragmentação do DNA e interrompem o ciclo celular (Creppy *et al.*, 2004).

I.1.4.1. ANIMAIS

Todos os problemas causados nas espécies animais estudadas estão relacionados com a inibição da biossíntese de esfingolípidos, sendo os órgãos mais afectados o fígado e o rim. Lesões mais avançadas de ambos os órgãos, em ratos, são caracterizadas por morte celular simultânea (apoptose) e proliferação celular (Voss *et al.*, 2001).

Em animais de experimentação, ratos, a FB₁ mostrou possuir um efeito promotor e iniciador de cancro, bem como actividade hepatocarcinogénica, nefrotóxica e produtora de lesões a nível do DNA (Hopmans e Murphy, 1993; Shephard *et al.*, 1996b; Westhuizen *et al.*, 2004; Domijan *et al.*, 2007). São ainda citadas a citotoxicidade em culturas de células de mamíferos (Marasas, 1996; Bacon *et al.*, 1992; 1996).

A toxicidade que provocam nos animais domésticos está sobejamente referenciada: a ELEM, um síndrome que atinge o sistema nervoso central dos cavalos e que leva à liquefacção da substância branca do cérebro; o PPE que aparece secundariamente devido a problemas cardiovasculares em suínos (Turner *et al.*, 1999; FAO/WHO, 2001; Kim *et al.*, 2003; Seefelder *et al.*, 2003); a indução de diarreia e redução do peso corporal em perus e frangos (Sydenham *et al.*, 1993; Shephard *et al.*, 2000); e também a toxicidade renal em ovelhas e coelhos (Meyer *et al.*, 2003).

Em macacos verificou-se a indução de apoptose em células hepáticas (Wang *et al.*, 1996), renais e quaisquer outras em que ocorre acumulação de esfinganina (e esfingosina) (Desai *et al.*, 2002), tendo sido também observadas alterações a nível renal e alterações em parâmetros bioquímicos do sangue e da urina (Gelderblom *et al.*, 2001).

Em 1991, Ross *et al.* analisaram alimentos compostos para avaliar os níveis de FB₁ e efectuaram a associação com a ELEM e o PPE. Os alimentos compostos associadas à ELEM apresentavam concentrações de FB₁ que variavam entre 1 µg g⁻¹ e 126 µg g⁻¹. O teor de FB₁ em alimentos compostos associados à PPE variava entre 1 µg g⁻¹ e 330 µg g⁻¹.

I.1.4.2. HOMEM

Com base nos dados actuais, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) classificou a FB₁ como possivelmente carcinogénica para o Homem, incluindo-a no grupo 2B (IARC, 2002).

Os níveis de FBs em milho contaminado por fungos estão epidemiologicamente correlacionados com alta incidência de EC em humanos. Esta patologia tem sido referenciada em regiões da África do Sul, Transkei, dos EUA, Carolina do Sul, dos cantões Linxian e Cixian na China (Rheeder *et al.*, 1992; Isaacson, 2005; Sydenham *et al.*, 1991; Chu e Li, 1994; Shephard *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2007), na região meridional do Brasil (Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul) (Westhuizen *et al.*, 2003), na província de Mazandaran do Irão (Shephard *et al.*, 2000) e no nordeste de Itália (Piñeiro *et al.*, 1997; Solfrizzo *et al.*, 1997). Esses níveis são superiores a 118 µg g⁻¹ em Transkei e a 155 µg g⁻¹ na China (Munkvold e Desjardins, 1997; Turner *et al.*, 1999).

As populações da África do Sul e da China apresentam os números mais elevados de EC do mundo. Enquanto no Ocidente o aparecimento deste tumor é atribuído a factores como o tabaco e álcool, nas regiões referidas estes factores não são considerados significativos (Turner *et al.*, 1999). Pensa-se que a substituição do sorgo pelo milho na dieta dos indivíduos de raça negra da África do Sul levou ao aparecimento de EC. Durante vários anos o sorgo constituiu a dieta base destes indivíduos, tendo sido gradualmente substituído pelo milho a partir do início do século XX. Após a primeira metade deste mesmo século o EC, até esta altura infrequente, aumentou até proporções consideradas epidémicas. O fungo *Fusarium* não se desenvolve adequadamente no

sorgo, sendo a produção de fumonisinas neste cereal duas vezes inferior à observada no milho. A elevada incidência da patologia em indivíduos negros é atribuída ao elevado consumo da cerveja tradicional, produzida através da fermentação de milho, tendo-se verificado que doentes com EC apresentavam maior consumo de cerveja relativamente ao grupo controlo. Os países africanos onde se observa uma dieta baseada no consumo de sorgo apresentam uma baixa incidência desta doença (Isaacson, 2005).

As FBs têm sido consideradas como suspeitas no aumento da incidência de alterações no tubo neural (NTD) entre a população que vive ao longo da fronteira Texas-México (Stack, 1998; Marasas *et al.*, 2004; Missmer *et al.*, 2006). Segundo Missmer *et al.* (2006) a exposição às FBs aumenta o risco de NTD proporcionalmente à quantidade ingerida, aumentando a probabilidade de ocorrer morte fetal.

I.1.5. INTERACÇÃO COM OUTRAS MICOTOXINAS

Diferentes micotoxinas, produzidas pela mesma ou por diferentes espécies fúngicas, ocorrem simultaneamente em produtos derivados de plantas. No entanto, existe pouca informação no que diz respeito à interacção de micotoxinas concomitantes e às consequências que daí advêm em relação à toxicidade (Speijers e Speijers, 2004).

Estudos adequados para estabelecer efeitos antagónicos, aditivos ou sinérgicos decorrentes da exposição a micotoxinas combinadas são raros. Neste campo, é essencial perceber o modo de acção de cada micotoxina a nível celular para se compreender a interacção com a toxicidade de outras micotoxinas. Seria de esperar que micotoxinas com modos de acção semelhantes apresentassem, pelo menos, efeitos aditivos. Pelo contrário, algumas interacções podem apresentar efeitos subtractivos (Speijers e Speijers, 2004). Como exemplo dum efeito subtractivo pode citar-se a interacção entre as esfingofunginas (inibidoras da serina palmitoil transferase fúngica) e as FBs. Esta interacção previne a acumulação de bases esfingóides livres (Speijers e Speijers, 2004).

Infelizmente, as micotoxinas não podem ser classificadas com base no seu mecanismo de acção dada a diversidade de estruturas químicas em questão. No entanto, o conhecimento do modo de acção *in vitro* pode fornecer a base racional para prever interacções entre micotoxinas (Speijers e Speijers, 2004). Estas considerações teóricas, baseadas no modo de acção a nível celular, podem não conduzir à resposta final esperada, pois o comportamento toxicocinético e os aspectos toxicodinâmicos de cada uma influenciam o resultado da exposição a um conjunto combinado de micotoxinas (Speijers e Speijers, 2004).

Em estudos realizados com suínos desmamados, a administração combinada de FBs, DON, toxina T-2 e OTA deu origem, em geral, a alterações semelhantes às observadas aquando da administração de OTA isoladamente. Apenas se observou que ocorreu supressão na formação de radicais e anticorpos quando a OTA foi combinada com FB₁ ou com DON, o que não se verificou na administração isolada de OTA. A amplificação sinérgica de alterações imunossupressivas devido ao consumo simultâneo destas micotoxinas em baixas concentrações é pouco provável (Müller *et al.*, 1999).

Groten *et al.* (1998) e Tajima *et al.* (2002) estudaram a interacção entre 5 tipos de micotoxinas (NIV, DON, toxina T-2, ZEA e FB₁) na inibição da síntese de DNA em fibroblastos. Os resultados mostraram que a exposição combinada a diferentes classes de micotoxinas geralmente conduzem a um efeito aditivo, havendo algumas excepções que indicam interacção sinérgica. No entanto, a magnitude da interacção foi relativamente pequena para NIV, DON, T-2, ZEA e FB₁. A interacção entre ZEA e FB₁ foi interpretada como sinérgica no que diz respeito à inibição da síntese de DNA.

Creppy *et al.* (2004) estudaram a interacção entre OTA e FB₁ em diferentes tipos de linhas celulares, *in vitro*, com o objectivo de prever a toxicidade *in vivo*. Os efeitos combinados de OTA e FB₁ são claramente de natureza sinérgica *in vitro*, sendo as concentrações das micotoxinas testadas muito importantes para os resultados obtidos. No entanto, Kubena *et al.* (1997) demonstraram, *in vivo*, efeitos aditivos entre FB₁ e OTA através de estudos realizados com perus jovens.

O facto de se encontrarem interacções sinérgicas entre FB₁ e OTA depende das doses usadas. O sinergismo na toxicidade de FB₁ e OTA pode estar relacionado com a capacidade de ambas as toxinas produzirem espécies reactivas de oxigénio e com a capacidade de comprometerem mais ou menos especificamente a síntese de proteínas e de macromoléculas celulares (Creppy *et al.*, 2004).

Os resultados de McKean *et al.* (2006) demonstraram que as FBs e as AFs interagem para produzir alterações nas respostas toxicológicas, apresentando uma interacção fortemente positiva que foi possível observar em ratos F344.

I.1.6. PRESENÇA EM ALIMENTOS E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO

A incidência de FBs verifica-se a nível mundial e é clara a sua presença em alimentos destinados a humanos e animais dada a prevalência destas micotoxinas no milho (Shephard *et al.*, 1996a), uma vez que cerca de 90% do *F. moniliforme* se encontra no referido cereal (Fumonisins Page).

A FB₁ é a fumonisina predominante, encontrada no milho naturalmente contaminado, e constitui normalmente cerca de 70% da quantidade total de FBs presentes (Polling e Plattner, 1999).

A primeira descrição da ocorrência natural de FB₁ foi realizada por Sydenham *et al.* (1990) a partir de milho contaminado da região do Transkei, na África do Sul, onde se verificava alta incidência de EC no Homem. Os níveis detectados nas amostras variavam entre 44 e 83 µg g⁻¹ (Pozzi *et al.*, 2002).

A relação entre o milho e o *Fusarium moniliforme* é uma relação endófito, trazendo benefícios para a planta. Assim, pode estimular o seu crescimento e desenvolvimento, uma vez que produz hormonas promotoras do seu crescimento, protege a planta contra outros agentes patogénicos ou insectos, reduz a infecção por *Aspergillus flavus*, reduzindo a produção de aflatoxinas, e diminui a infecção por *Fusarium graminearum* (Munkvold e Desjardins, 1997).

Apesar de ter sido sugerida a existência de uma relação negativa entre *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. na contaminação do milho, de acordo com

Abbas *et al.* (2006), se tal relação existisse seria expectável que os níveis de AFs e FBs estivessem correlacionados negativamente. Os autores referidos investigaram a contaminação de FBs em híbridos de milho do Arkansas tendo verificado, no entanto, uma correlação positiva entre os níveis dos dois tipos de micotoxinas durante o período estudado, o que indica que uma infecção natural por *Fusarium* spp. não protege contra a produção de AFs.

Por outro lado, no milho, o *Fusarium moniliforme* pode provocar a decomposição do caule, da espiga e do grão. O vento, a chuva e os insectos podem conduzir à dispersão do fungo, podendo os insectos ser responsáveis por infecções entre culturas de anos diferentes. O fungo chega ao grão através das barbas e cresce através do pericarpo até ao seu interior. Ocasionalmente, as hifas podem ser encontradas no embrião e endosperma. O pericarpo constitui, portanto, um meio de defesa, pelo que a sua danificação pode levar à contaminação do grão (Nelson, 1991).

I.1.6.1. ALIMENTOS DESTINADOS AO CONSUMO ANIMAL

Em 1990 foi correlacionada a ocorrência de FBs com o diagnóstico de ELEM na África do Sul, analisando amostras de milho contaminado com concentrações de FB₁ que variavam de 37 a 122 µg g⁻¹ (Pozzi *et al.*, 2002). Nesse mesmo ano também se detectou a presença de FB₁ e FB₂ em amostras de milho destinados a cavalos e suínos nos Estados Unidos que apresentavam ELEM e PPE, respectivamente (Ross *et al.*, 1990). Na Tabela I.2 observam-se os níveis médios de FBs associados a epidemias de ELEM.

Tabela I.2 Níveis médios de FBs em alimentos compostos associados à ELEM.

País	FB ₁ (ng g ⁻¹)	FB ₂ (ng g ⁻¹)	Referência
África do Sul	8850	3000	Thiel <i>et al.</i> , 1992
EUA	7700	3100	Thiel <i>et al.</i> , 1992
Brasil	12000	4100	Sydenham <i>et al.</i> , 1992b
	400	50	

Em 1997, Scudamore *et al.*, analisaram a presença de micotoxinas em alimentos para animais domésticos. Foram encontradas FBs em 30% das amostras testadas, com um máximo de 750 $\mu\text{g g}^{-1}$ encontrado numa amostra de comida para gato. Os mesmos autores, em 1998, determinaram a quantidade de micotoxinas em alimentos compostos para animais. Relativamente às FBs verificaram que estas ocorreram em todas as amostras, excepto em duas amostras de glúten, em concentrações que variavam entre 32 mg kg^{-1} e 8 mg kg^{-1} .

Em Portugal, entre 1996 e 1999, foi analisada a qualidade micológica de alimentos compostos para bovinos. No que respeita ao género *Fusarium*, este foi encontrado em 20% das amostras, o que corresponde a um ligeiro decréscimo da contaminação dos referidos alimentos relativamente a épocas anteriores, perspectivando, assim, uma evolução qualitativa positiva (Martins e Martins, 2001).

I.1.6.2. ALIMENTOS DESTINADOS AO CONSUMO HUMANO

Inúmeras publicações científicas traduzem as preocupações em avaliar os níveis de FBs no milho e em alimentos contendo milho em diferentes países: nos EUA (Hopmans e Murphy, 1993), na fronteira Texas-México (Stack, 1998), na África do Sul (Sydenham *et al.*, 1990; 1991; 1992a), no Brasil (Westhuizen *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004; Bittencourt *et al.*, 2005), na Argentina (Sydenham *et al.*, 1993), na Suíça (Pittet *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1997), no Irão (Shephard *et al.*, 2000), no México (Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999; Cortez-Rocha *et al.*, 2003), na zona oeste do Quênia (Kedera *et al.*, 1999), na China (Weidenbörner, 2001; Wang *et al.*, 2008) em Itália (Cirillo *et al.*, 2003 a; b), em Espanha (Castellá *et al.*, 1999; Ariño *et al.*, 2007b), no Uruguai (Piñeiro *et al.*, 1997), no Canadá (Lombaert *et al.*, 2003), na Croácia (Domijan *et al.*, 2003), em França (Molinié *et al.*, 2005) e na Nigéria (Bankole e Mabekoje, 2004).

Na Tabela I.3 podem observar-se os níveis de FBs em alimentos destinados ao consumo humano de diferentes países.

Tabela I.3 Níveis de FBs em alimentos destinados ao consumo humano de diferentes países.

País	Ano	Tipo de Alimento	Teor de FBs	Referência
Espanha	1994 a 1996	Milho	FB ₁ : 3,3 µg g ⁻¹ FB ₂ : 1,7 µg g ⁻¹	Castellá <i>et al.</i> , 1999
México	–	Produtos processados a partir do milho	FB ₁ : 0,79 ppm	Dombrink–Kurtzman e Dvorak, 1999
México (Sonora)	1998/1999 1999/2000	Milho Milho	FB ₁ : 1,1 a 4,8 mg kg ⁻¹ FB ₁ : 0,4 a 4,4 mg kg ⁻¹	Cortez-Rocha <i>et al.</i> , 2003
EUA	–	Produtos processados a partir do milho	FB ₁ : 0,16 ppm	Dombrink- Kurtzman e Dvorak, 1999
	–	Colheitas; cereais para consumo humano	FB ₁ : 0,028 a 2,679 mg kg ⁻¹ FB ₂ : 0,03 a 0,797 mg kg ⁻¹	Gutema <i>et al.</i> , 2000
Uruguai	1995 a 1996	Milho não processado Milho processado Snacks	FB ₁ : 3688 ng g ⁻¹ FB ₁ : 155 ng g ⁻¹ FB ₁ : 314 ng g ⁻¹	Piñeiro <i>et al.</i> , 1997
Argentina	–	Milho	FB ₁ +FB ₂ +FB ₃ : 1585 a 9990 ng g ⁻¹	Sydenham <i>et al.</i> , 1993
	–	Milho	FB ₁ : 0,5 a 5 mg kg ⁻¹	Scudamore e Patel, 2000
Brasil	1999 a 2000	Milho para consumo humano	FB ₁ : 3,2 mg kg ⁻¹ FB ₂ : 3,4 mg kg ⁻¹ FB ₃ : 1,7 mg kg ⁻¹	Whesthuizen <i>et al.</i> , 2003
Brasil (São Paulo)	2000	Alimentos à base de milho Farinha de milho	FB ₁ : 1,1 a 15,3 mg kg ⁻¹ FB ₂ : 0,2 a 3,9 mg kg ⁻¹ FB ₁ : 0,5 a 7,2 mg kg ⁻¹ FB ₂ : 0,1 a 1,8 mg kg ⁻¹	Bittencourt <i>et al.</i> , 2005
Brasil (São Paulo)	–	Alimentos infantis à base de milho	FB ₁ +FB ₂ +FB ₃ : 2242 µg kg ⁻¹	Castro <i>et al.</i> , 2004
Canadá	1997 1998 1999 –	Alimentos infantis Cereais de pequeno-almoço	FB ₁ : 250 ng g ⁻¹ FB ₂ : 125 ng g ⁻¹ FB ₁ : 250 ng g ⁻¹ FB ₂ : 86 ng g ⁻¹ FB ₁ : 250 ng g ⁻¹ FB ₂ : 125 ng g ⁻¹ FB ₁ : 68 ng g ⁻¹ FB ₂ : 8 ng g ⁻¹	Lombaert <i>et al.</i> , 2003 Kim <i>et al.</i> , 2003
Reino Unido	–	Milho	FB ₁ +FB ₂ +FB ₃ >1000 µg kg ⁻¹	Scudamore e Patel, 2000
Itália	2001 a 2002	Cereais e alimentos processados	FB ₁ : 0,010 a 2,870 µg g ⁻¹ FB ₂ : 0,010 a 0,790 µg g ⁻¹	Cirillo <i>et al.</i> , 2003a
Suíça	1991	Produtos processados a partir do milho	FB ₁ : 55 a 790 ng g ⁻¹ FB ₂ : 50 a 160 ng g ⁻¹	Pittet <i>et al.</i> , 1992
França	–	Cereais de pequeno-almoço	FB ₁ : 1 a 1110 µg kg ⁻¹	Molinié <i>et al.</i> , 2005

Tabela I.3 Níveis de FBs em alimentos destinados ao consumo humano de diferentes países (continuação).

País	Ano	Tipo de Alimento	Teor de FBs	Referência
Portugal	1992	Milho	FB ₁ : 90 a 2300 µg kg ⁻¹ FB ₂ : 250 a 4450 µg kg ⁻¹	Doko <i>et al.</i> , 1995
	–	Chá preto e plantas medicinais	FB ₁ : 20 a 700 µg kg ⁻¹	Martins <i>et al.</i> , 2001
Irão	1998	Milho	FB ₁ : 1,270 a 3,980 µg g ⁻¹ FB ₂ : 0,190 a 1,175 µg g ⁻¹ FB ₃ : 0,155 a 0,960 µg g ⁻¹	Shephard <i>et al.</i> , 2000
África do Sul (Transkei)	1989	Milho saudável (EC elevado)	FB ₁ : 0 a 5380 ng g ⁻¹ FB ₂ : 0 a 1320 ng g ⁻¹	Thiel <i>et al.</i> , 1992
		Milho bolorento (EC elevado)	FB ₁ : 3020 a 117520 ng g ⁻¹ FB ₂ : 750 a 22960 ng g ⁻¹	
China (Cantão Cixian)	1991	Milho saudável	FB ₁ : 30300 a 47900 µg kg ⁻¹	Weidenbömer, 2001
(Cantão Linxian)	2005/06	Alimentos não processados Alimentos processados	FB ₁ : 0,31 a 0,63 µg g ⁻¹ FB ₁ : 0,21 a 0,28 µg g ⁻¹	Wang <i>et al.</i> , 2008
Quênia	–	Milho	FB ₁ : apenas 5% das amostras acima de 1000 ng g ⁻¹ (limite para consumo humano)	Kedera <i>et al.</i> , 1999
Nigéria (Sudoeste)	2001	Milho	FB ₁ : 70 a 1780 µg kg ⁻¹ FB ₂ : 53 a 230 µg kg ⁻¹	Bankole e Mabekoje, 2004
Turquia	–	Chá de ervas Plantas medicinais	FB ₁ : 0,160 a 1,487 µg g ⁻¹	Omurtag e Yazicioglu, 2004

Scudamore e Patel (2000) mostraram que a contaminação por FB₁ decresce com o aumento da latitude. Em particular, amostras do sul de França e Espanha apresentavam maior concentração de FB₁ do que amostras do norte de França. Investigações realizadas na Europa do Sul revelaram que o *Fusarium verticillioides* é o fungo predominante do milho e que o *Fusarium proliferatum* é frequentemente encontrado com o primeiro. Por outro lado, na Europa Central e do Norte os fungos prevalecentes são: o *F. graminearum*, o *F. culmorum* e o *F. subglutinans*. Sendo o *F. verticillioides* e o *F. proliferatum* os principais produtores de FB₁, a sua presença no Sul da Europa explica a elevada concentração desta micotoxina nesta zona do planeta (Pietri *et al.*, 2004).

Especial atenção deve ser dada à presença de FBs na dieta de populações vulneráveis, como são as crianças, atendendo a que os alimentos à base de cereais são uma importante fonte nutritiva da sua dieta, que a quantidade que consomem é proporcionalmente mais elevada, em relação ao seu peso corporal, do que os adultos, que a sua dieta é mais limitada e que a sua fisiologia é diferente (Lombaert *et al.*, 2003).

I.1.6.3. INGESTÃO DIÁRIA ESTIMADA VS INGESTÃO DIÁRIA TOLERÁVEL

Uma das formas de avaliação da exposição de populações às FBs consiste em calcular a ingestão diária estimada (EDI), através dos níveis de FBs ingeridos nos distintos itens alimentares. Um estudo de avaliação da contaminação do milho e de produtos à base de milho com FBs, realizado a nível mundial sob orientação da Commission on Food Chemistry of the International Union of Pure and Applied Chemistry, concluiu que, na região de Transkei (África do Sul), o consumo diário de milho será de 460 g, enquanto na Alemanha e Reino Unido é apenas de 7 g e na Suíça de 4 g. Assim sendo, para indivíduos com um peso de 70 kg que ingerem milho com uma contaminação média de FBs de $1,7 \mu\text{g g}^{-1}$, na região de Transkei, e de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$, na Europa, a ingestão diária provável (PDI) nessas populações é de $11,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ peso corporal/dia, de $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ p.c./dia e de $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$ p.c./dia em Transkei, na Alemanha e Reino Unido, e na Suíça, respectivamente (Shephard *et al.*, 1996a).

De acordo com dados mais recentes, o consumo total de FBs nas dietas europeias foi estimado em cerca de $1,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ p.c./semana (EMAN, 2000). Foi proposta uma ingestão diária tolerável (TDI) de 800 ng kg^{-1} p.c./dia para a FB₁ (Soriano e Dragacci, 2004).

O European Mycotoxin Awareness Network (EMAN, 2000) e a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002) consideram que a ingestão diária máxima tolerável provisória (PMTDI) para humanos é de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ p.c./dia para a FB₁. Este valor foi também o estabelecido pela União Europeia em 2005 para a FB₁, FB₂ e FB₃, isoladamente ou combinadas (EC N.º 856/2005). De acordo com

esta recomendação, uma criança de 20 kg não deverá exceder uma dose diária de 40 µg (Molinié *et al.*, 2005). Tendo em conta este valor, e mesmo considerando uma TDI de 0,8 µg kg⁻¹ p.c./dia, esta ingestão nas populações dos países do norte da Europa é claramente inferior, enquanto que as populações do Brasil, China e África do Sul podem estar em risco (Shephard *et al.*, 1996a; Soriano e Dragacci, 2004).

I.1.7. PROCESSOS DE DESCONTAMINAÇÃO

A extensão da contaminação do milho bruto com FBs está dependente de diversos factores como a localização geográfica, as práticas agronómicas e de conservação, e da vulnerabilidade das plantas à invasão por fungos durante todas as fases de crescimento, conservação e processamento. Os níveis de FBs são também influenciados por factores ambientais como temperatura, humidade e chuva durante os períodos de pré-colheita e colheita e pela infestação com insectos (USFDA-CFSAN, 2001a).

As micotoxinas que normalmente ocorrem em cereais e outros produtos não são completamente destruídas durante o processamento dos alimentos, podendo assim estar presentes em produtos processados (Bullerman e Bianchini, 2007).

Existem diferentes métodos de descontaminação – físicos, químicos e biológicos. De acordo com a European Mycotoxin Awareness Network (EMAN) (EMAN, 2000), o processo ideal de descontaminação deve ser fácil de aplicar, económico, não deve dar origem à formação de compostos que ainda apresentem toxicidade, ou alterar as propriedades nutricionais e a palatibilidade dos alimentos.

O grau de descontaminação depende do método usado e da toxicidade que subsiste na amostra tratada (Soriano e Dragacci, 2004). Pode ocorrer redução do teor de FBs, mas não se registar diminuição da toxicidade devido a alterações nas moléculas das FBs (Munkvold e Desjardins, 1997), nomeadamente a formação PHFBs ou HFBs aquando do tratamento com hidróxido de cálcio, vulgus nixtamilização (Soriano e Dragacci, 2004).

I.1.7.1. Físicos

As FBs são de difícil eliminação. Nos alimentos processados à base de milho, os níveis de FBs estão dependentes dos processos de moagem e de manufactura a que o milho em bruto é submetido.

A eliminação do germe e/ou do pericarpo pode dar origem a teores inferiores de FBs uma vez que estas se concentram no germe e no pericarpo (USFDA-CFSAN, 2001b). Este processo pode ser considerado um procedimento preliminar na descontaminação de FBs, que pode reduzir o seu conteúdo entre 26,2% e 64,4% (Soriano e Dragacci, 2004).

A moagem seca ou húmida pode reduzir o teor de FBs nos alimentos (Soriano e Dragacci, 2004). Na moagem seca verifica-se um aumento da concentração de FBs no pericarpo. Na moagem húmida as FBs migram para a solução aquosa, sendo reduzida a sua concentração (EMAN, 2000).

Apesar das FBs serem termicamente estáveis, temperaturas superiores a 150°C são eficazes na remoção destas micotoxinas das amostras (Soriano e Dragacci, 2004). Mas a sua eficácia depende da relação tempo – temperatura. No entanto, estes processos térmicos de descontaminação resultam na conversão de FBs intactas em FBs hidrolisadas (Polling e Plattner, 1999) que são mais citotóxicas que a FB₁ (Seefelder *et al.*, 2003). Na preparação dos flocos, o teor em FBs pode ser reduzido durante a extrusão do milho meio moído, da farinha de milho, da conversão em flocos e do tostar do milho (Kim *et al.*, 2003). Também nas pipocas pode ocorrer redução significativa de FBs, que podem estar presentes no grão inteiro (USFDA-CFSAN, 2001b).

Outro método físico de descontaminação envolve a utilização de materiais adsorventes com capacidade para se ligarem eficazmente às micotoxinas e imobilizarem-nas no tracto gastrointestinal dos animais, reduzindo a biodisponibilidade da toxina. Exemplos destes materiais são o carvão activado, a colestiramina (Soriano e Dragacci, 2004; Avataggiato *et al.*, 2005), o aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado e a montmorilonite egípcia (Aly *et al.*, 2004). Estes dois últimos adsorventes manifestaram capacidades de adsorção entre 88,2% e

92,5% para a FB₁ presente em extractos de malte usado na indústria alimentar e em bebidas (Aly *et al.*, 2004).

Solfrizzo *et al.* (2000) testaram diversos materiais adsorventes a 1 mg mL⁻¹ para estudar a sua capacidade de adsorver FB₁ em soluções aquosas. Para uma solução contendo 200 µg mL⁻¹ de FB₁, a colestiramina mostrou maior capacidade adsorvente (85%), seguindo-se o carvão activado (62%). A bentonite adsorveu apenas 12% da toxina numa solução que continha 13 µg mL⁻¹ de FB₁, enquanto que a celite não se mostrou eficaz, nem mesmo aquando do ensaio com a menor concentração de FB₁ (3,2 µg mL⁻¹).

No entanto, materiais adsorventes que se mostram eficazes *in vitro* não são necessariamente eficazes quando testados *in vivo* (Avantaggiato *et al.*, 2005). Estes autores verificaram que a eficácia do carvão activado *in vitro* não se confirmou *in vivo*.

Outro método físico consiste na utilização de radiação gama, observando-se uma redução de cerca de 20% no conteúdo de FB₁ e FB₂ em amostras de milho, para intensidade de radiação da ordem de 15 kGy (Soriano e Dragacci, 2004). No entanto, Aziz *et al.* (2007) ao aplicarem uma radiação na ordem de 5 kGy observaram uma inactivação da FB₁ em cerca de 96,6%, 87,1% e 100% no trigo, milho e cevada, respectivamente, tendo verificado que 7 kGy foi suficiente para a completa destruição de FB₁ no trigo e no milho. Castro *et al.* (2007) verificaram ser possível a diminuição do risco de exposição às FBs através da irradiação do milho com valores entre 5 e 10 kGy. No entanto, para uma intensidade de 2 kGy os fungos que conseguem sobreviver (36%) podem produzir mais FBs relativamente aos do grupo controlo que não sofreram qualquer irradiação.

I.1.7.2. QUÍMICOS

A lavagem com água ou com uma solução de bissulfito de sódio pode reduzir o teor de FBs nos alimentos (Soriano e Dragacci, 2004). O recurso a solução saturada de cloreto de sódio pode originar perdas da ordem dos 86% em milho contaminado com FB₁ (Shetty e Bhat, 1999).

O tratamento com hidróxido de amónio pode reduzir em 79% os níveis de FB₁ em milho contaminado. A nixtamilização, que consiste no tratamento do milho com hidróxido de cálcio, Ca(OH)₂, pode reduzir a concentração de FBs em cerca de 50% (Soriano e Dragacci, 2004). Este processo é usado na produção de *masa* usada na preparação de *tortilla*, substituto mexicano do pão e tiras de milho (Dombrink-Kurtzman *et al.*, 2000; Seefelder *et al.*, 2003). Amra *et al.* (2003) encontraram perdas da ordem dos 66% aquando do processamento de *tortilla*. Porém, ambos os métodos conduzem ao aparecimento de HFBs e PHFBs – em que são removidos os dois ou apenas um grupo de ácido tricarbóxico da molécula de fumonisina, respectivamente – que continuam a exercer efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos (Polling e Plattner, 1999; Seefelder *et al.*, 2003; Soriano e Dragacci, 2004).

Uma combinação de métodos químicos, como a nixtamilização, e físicos, como o tratamento com temperaturas elevadas, pode reduzir a concentração de FBs em 79% (Soriano e Dragacci, 2004).

A maior redução na quantidade de FBs ocorre quando a temperatura de extrusão é igual ou superior a 160 °C e na presença de glucose. A extrusão de *corn grits*, contaminados com FBs e adicionados de glucose a 10%, resultou numa redução de 75 a 85% dos níveis de FB₁. Alguns produtos de degradação são formados no decorrer do processo de extrusão, incluindo pequenas quantidades de HFB₁ e N-(carboximetil)-FB₁ e quantidades mais elevadas de N-(1-desoxi-D-fructose)-FB₁ quando se verifica a adição de glucose durante o processo de extrusão (Bullerman e Bianchini, 2007).

O efeito tóxico da FB₁ pode ser eliminado, em cerca de 95%, durante o processamento do milho por reacção entre a micotoxina e a frutose, já que a amina primária das FBs pode reagir com o grupo carboxilo do açúcar redutor quando este é aquecido a 80°C durante 48 horas, formando-se bases de Schiff que, posteriormente, se convertem em outros produtos de escurecimento não enzimático destituídos de perigo (Soriano e Dragacci, 2004).

A ozonização foi tentada, mas a conversão da FB₁ em 3-ceto FB₁, composto dotado de toxicidade mais elevada, colocou de lado esta tentativa de oxidação (Soriano e Dragacci, 2004).

I.1.7.3. BIOLÓGICOS

Os métodos físicos e químicos possuem grandes desvantagens, nomeadamente eficácia limitada, perda de nutrientes e alto custo, pelo que muitos investigadores são de opinião que a melhor solução para a descontaminação, no futuro, aponta essencialmente para a descontaminação por biodegradação.

A descontaminação de micotoxinas por processos biológicos tem enveredado pelo recurso a bactérias, iniciando-se esta nos anos 60, ou a processos fermentativos, em que o uso de leveduras se iniciou nos anos 80 (Bata e Lásztity, 1999). Nos últimos tempos têm sido também referenciados o recurso a compostos presentes em extractos de plantas ou a modificações genéticas (Soriano e Dragacci, 2004).

Uma forma de controlar biologicamente o *Fusarium moniliforme* consiste na utilização de uma bactéria endófitas, *Bacillus subtilis*, que reduz a acumulação de FB₁ durante a fase do ciclo de vida do fungo em que não se observa infecção apesar deste estar presente. Tal facto observa-se uma vez que a bactéria compete com o fungo pelo mesmo nicho ecológico na planta (Bacon *et al.*, 2001; Cavaglieri *et al.*, 2005).

Foi também tentado o uso da levedura *Exophiala spinifer* que promove a hidrólise da FB₁ em aminopentol e ácido tricarboxílico, tendo também a capacidade de descontaminar o aminopentol com a libertação de CO₂ (Soriano e Dragacci, 2004). A utilização de três variedades de *Saccharomyces* durante oito dias originou reduções de cerca de 28% para a FB₁ e 17% para a FB₂ (Bata e Lásztity, 1999).

Diversos compostos naturais de plantas podem ser usados. O majonósido-R2, saponina extraída de raízes e rizomas de *Panax vietnamensis*, diminui a actividade da FB₁ como promotora de tumores em ratos. O eugenol, óleo presente no cravo-da-índia, inibe o crescimento de *Fusarium moniliforme* e regula a produção de FBs (Soriano e Dragacci, 2004). Diversos compostos fenólicos inibem o crescimento daquele fungo, reduzindo a produção de FB₁ (Beekrum *et al.*, 2003). O extracto de isoflavona de soja reduz a actividade hepatotóxica

da FB₁ em ratos devido à supressão da produção de prostaglandina que estimula a FB₁ (Soriano e Dragacci, 2004).

O milho transgênico, milho *Bt*, expressa uma toxina de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) que aumenta a resistência da planta ao fungo uma vez que aumenta a resistência da mesma a insectos. A diminuição da infecção por *Fusarium* pode também dever-se ao aumento da expressão de proteínas anti-fúngicas específicas e metabolitos ou conseguir-se acentuando as próprias defesas da planta nos tecidos dos grãos. Outra estratégia de modificação genética consiste no uso de genes que codificam enzimas que degradam as FBs. Estas enzimas foram identificadas em fungos isolados no milho, tendo os genes que as codificam sido clonados e colocados em milho transgênico (Duvick, 2001).

Não obstante a diversidade de métodos conducentes à descontaminação, os métodos de descontaminação *in vitro* não são necessariamente aplicáveis *in vivo*.

I.1.8. LEGISLAÇÃO

Não existe uma legislação global para regular os níveis permitidos de FBs no milho e em produtos processados a partir do mesmo. Mais de 90 países apresentam regulamentação própria ou níveis máximos para algumas micotoxinas, dependendo do tipo de matriz (Cirillo *et al.*, 2003a).

Relativamente aos alimentos para animais, a Food and Drug Administration (FDA) recomenda níveis máximos de FBs de 1, 10, 30, 50 e 15 mg kg⁻¹ em alimentos compostos para cavalos, suínos, ruminantes, aves e vacas leiteiras, respectivamente (USFDA-CFSAN, 2001c).

Em 2004, a Comissão Europeia recomendou que os estados membros deveriam realizar durante esse mesmo ano um programa coordenado de controlo destinado a verificar a concentração de micotoxinas em alimentos para animais indicando a metodologia de análise, para assim se estabelecerem teores máximos de micotoxinas, nomeadamente de FBs, em alimentos para animais (Jornal Oficial da União Europeia, 2004). Assim, em Agosto de 2006, pela recomendação

2006/576/EC foram fixados os valores para a soma da FB_1+FB_2 que variam entre 60 mg kg^{-1} , para matérias-primas para alimentação animal – milho e produtos à base de milho, e 5 mg kg^{-1} para alimentos complementares e alimentos completos para suínos, cavalos, coelhos e animais de companhia.

Relativamente aos alimentos para consumo humano, na Suíça, em 1997, o Swiss Federal Office of Public Health estabeleceu um valor de tolerância de $1,0 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ para a soma da FB_1 e FB_2 em produtos processados a partir do milho seco para consumo humano (Shephard *et al.*, 2000; Cirillo *et al.*, 2003a; Soriano e Dragacci, 2004).

O French Council of Public Hygiene recomendou um valor máximo de $3,0 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ para a FB_1 e FB_2 em cereais. A FDA, em 2000, aconselhou níveis de $2\text{-}4 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ em cereais que, na altura, foram considerados em Itália como limites de referência (Cirillo *et al.*, 2003a). A FDA considera que os níveis recomendados para as FBs no milho e derivados para consumo humano são uma medida prudente para a Saúde Pública (USFDA-CFSAN, 2001b).

A Eslováquia estabeleceu limites no milho contaminado, não devendo exceder 100 a $200 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (Labuda *et al.*, 2003).

Em 2005, uma vez que certos Estados Membros tinham adoptado, ou planeavam adoptar, níveis máximos para as toxinas de *Fusarium*, como o DON, a ZEA e as FBs, em determinados alimentos e tendo em conta a disparidade resultante e conseqüente risco de distorção da concorrência, a União Europeia tomou medidas no sentido de estabelecer limites para assegurar a estabilidade do mercado. Assim, a Comissão Europeia recomendou, mas não legislou, níveis máximos de FB_1+FB_2 que variaram entre $2000 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ em milho não processado e $200 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ em alimentos infantis (EC N.º 856/2005).

Os valores recomendados em Junho de 2005 pelo regulamento EC N.º 856/2005 foram fixados em Dezembro de 2006 pelo regulamento EC N.º 1881/2006. De acordo com este regulamento, devem ser definidos teores máximos rigorosos que sejam razoavelmente possíveis mediante a prossecução de boas práticas agrícolas e de fabrico. Estas práticas, relativas à prevenção e redução de toxinas de *Fusarium* em cereais e produtos à base de cereais, encontram-se

estabelecidas por recomendação da Comissão de 17 Agosto de 2006 (2006/583/EC). Segundo estas recomendações devem-se envidar todos os esforços para continuar a reduzir a presença destas toxinas nos alimentos referidos, com o objectivo último de proteger a saúde pública, nomeadamente grupos vulneráveis como lactentes, crianças e jovens.

No entanto, segundo um novo regulamento da Comissão Europeia de Setembro de 2007, EC N.º 1126/2007, dados recentes indicam que, para as colheitas de 2005 e 2006, observaram-se no milho teores mais elevados de toxinas do que nas colheitas de 2003 e 2004, especialmente de ZEA e de FBs e, em menor grau, de DON, devido às condições atmosféricas. Por conseguinte, em determinadas condições atmosféricas, os teores previstos para a ZEA e as FBs não são alcançáveis no que respeita ao milho, mesmo aplicando as medidas de prevenção possíveis. Assim, a fim de evitar a perturbação do mercado, os teores máximos foram alterados, embora mantendo um elevado nível de protecção da saúde pública, ao assegurar que a exposição humana se mantém significativamente abaixo do valor indicativo baseado nos efeitos sobre a saúde. Deste modo, foram fixados novos valores, a aplicar após 1 de Outubro de 2007, que para alguns alimentos sofreu uma duplicação, variando agora o somatório da FB_1 e FB_2 entre $4000 \mu\text{g kg}^{-1}$ – em milho não transformado com excepção do milho não transformado destinado à moagem por via húmida – e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ – em alimentos transformados à base de milho para bebés, lactentes e crianças jovens (Tabela I.4).

A legislação portuguesa adoptou as medidas estabelecidas pela Comissão Europeia em Diário da República N.º 44 de 2 de Março 2006 através do Decreto-Lei n.º 50/2006.

Na Tabela I.4 podem observar-se os níveis máximos de FBs permitidos em diferentes países, em milho e alimentos derivados.

O Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives fixou uma PMTDI de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ p.c./dia para as FB_1 e FB_2 isoladas ou combinadas em alimentos para humanos (FAO/WHO, 2001). O mesmo valor foi estabelecido pela Comissão Europeia em 2005 (EC N.º 856/2005) para o total de FB_1 , FB_2 e FB_3 isoladas ou combinadas.

As colheitas caseiras de milho da África do Sul contêm geralmente elevados níveis de fungos produtores de FBs, apresentando níveis destas micotoxinas que geralmente ultrapassam os limites estabelecidos pela União Europeia para a soma de FB_1+FB_2 . Um consumo durante toda a vida destes alimentos pode ser perigoso, sendo fundamental uma análise estratificada e multianual de amostras para melhor perceber os factores que influenciam a contaminação do milho por FBs. Este procedimento pode eventualmente conduzir a recomendações que minimizem os riscos associados à dieta da maior parte da população africana que é baseada no milho (Waalwijk *et al.*, 2008).

O relatório do Council for Agricultural Science and Technology estabelece que um dos objectivos para o século XXI é o desenvolvimento de uma legislação uniforme, a nível mundial, para a contaminação dos alimentos por micotoxinas. Os objectivos serão a identificação das nações que seriam sujeitas a um maior impacto, caso se estabelecesse legislação mais rígida, e a avaliação dos benefícios para a saúde humana, bem como os prejuízos a nível económico, caso se optasse por tal. Estes padrões legislativos levariam a que, entre as nações industrializadas, fossem os Estados Unidos a experimentar maiores perdas económicas. As condições ambientais dos países em desenvolvimento são, no entanto, mais favoráveis à acumulação de micotoxinas. Contrariamente às preocupações expressas pelos legisladores, não seriam os países menos desenvolvidos, como as nações africanas sub-sarianas, a experimentar as maiores perdas económicas, mas antes a China e a Argentina. Se fosse implementado a nível mundial um limite de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ para as FBs, o prejuízo total nas exportações, devido à contaminação do milho por FBs, excederia os 300 milhões de dólares/ano. Caso se adoptassem os limites menos restritivos dos Estados Unidos, 2 mg kg^{-1} , os prejuízos seriam 3 vezes inferiores (Wu, 2004).

Tabela I.4 Níveis máximos de FBs permitidos em diferentes países, em milho e alimentos derivados.

País	Tipo de Alimento	Níveis máximos permitidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
		FB ₁	FB ₂	FB ₁ +FB ₂
Suíça (1997)	Milho consumo humano			1000
French Council of Hygiene	Cereais	3000	3000	
Eslováquia	Milho	100–200		
US-FDA/Itália (2000)	Milho e derivados			2000–4000
Comissão Europeia (2005/2006)	Milho não transformado			2000
	Farinha, sémola, grits, gérmem e óleo de milho refinado			1000
	Alimentos à base de milho para consumo directo com excepção dos restantes referidos			400
	Alimentos transformados à base de milho para bebés, lactentes e crianças jovens			200
Comissão Europeia (2007)	Milho não transformado exceptuando o destinado à moagem húmida			4000
	Milho destinado ao consumo humano directo, alimentos à base de milho para consumo humano directo, com excepção dos restantes referidos			1000
	Cereais para pequeno-almoço à base de milho e refeições leves à base de milho			800
	Alimentos transformados à base de milho para bebés, lactentes e crianças jovens			200
	Fracções de moagem do milho e outros produtos de moagem com partículas de dimensões > 500 mícron que não se destinem ao consumo humano directo			1400
	Fracções de moagem do milho e outros produtos de moagem com partículas de dimensões \leq 500 mícron que não se destinem ao consumo humano directo			2000

I.2. METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS EM ALIMENTOS

Os problemas e riscos associados à contaminação por FBs de alimentos compostos para animais e alimentos humanos resultaram no desenvolvimento de métodos precisos, fidedignos e sensíveis para a determinação das mesmas nas matrizes referenciadas (Shephard, 1998). Com a finalidade de avaliar a

exposição às FBs é essencial metodologia analítica sensível, exacta e reprodutível para a sua detecção. Desde a descoberta destas micotoxinas e sua caracterização em 1988, houve um progresso significativo nos métodos analíticos usados para as detectar (Duncan *et al.*, 1998).

A grande maioria dos métodos referenciados envolve extracção, recorrendo a misturas de solventes polares, seguido de um processo de purificação com extracção em fase sólida (SPE) com colunas de fase reversa, cartuchas de troca aniónica forte (SAX) ou colunas de imunoafinidade (IAC).

A detecção e quantificação são efectuadas principalmente recorrendo a métodos cromatográficos, como a cromatografia líquida (LC) com detecção fluorimétrica (LC-FD), a mais utilizada, ou com detecção por espectrometria de massa (LC-MS), a cromatografia em camada fina (TLC), e a cromatografia gasosa (GC) associada a diferentes detectores, como o de massa (GC-MS). O desenvolvimento de métodos imunológicos, como *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), permite análises mais rápidas que podem ser aplicados em procedimentos de *screening*. Métodos electroforéticos, como a electroforese capilar de zona (CZE), podem constituir uma alternativa, embora menos usados.

Porém, algumas destas técnicas não respondem às necessidades actuais, dada a sua morosidade, o facto de requererem equipamento extremamente caro e não apresentarem sensibilidade adequada (Duncan *et al.*, 1998).

I.2.1. EXTRACÇÃO

A capacidade de extracção das FBs a partir de produtos à base de milho pode variar significativamente e ser influenciada por factores como a composição química da matriz, o tipo de solvente de extracção e respectivo volume, o pH do solvente de extracção bem como de outras condições experimentais (Voss *et al.*, 2001).

Com o objectivo de garantir uma extracção eficaz das FBs presentes em matrizes alimentares, vários solventes têm sido preconizados (Tabela I.5).

Em virtude de se tratar de moléculas fortemente polares, as FBs são solúveis em água e solventes polares e insolúveis em solventes orgânicos (Pozzi *et al.*, 2002).

A sua extracção a partir de matrizes alimentares é conseguida usando água, acetoneitrilo (ACN) e metanol (MeOH). Verificam-se, no entanto, variações no que diz respeito à mistura dos solventes, bem como no que se refere às proporções relativas usadas (Tabela I.5). Observa-se, de igual modo, alguma disparidade na quantidade de amostra usada no processo extractivo, variando esta entre 5 g (Kedera *et al.*, 1999) e 50 g (Lombaert *et al.*, 2003).

Tabela I.5 Processos de extracção e purificação aplicados à análise de FBs em alimentos.

Amostra	Extracção	Purificação	Referência
Ração	MeOH:H ₂ O (4:1)	IAC	Scudamore <i>et al.</i> , 1997; 1998 Cortez-Rocha <i>et al.</i> , 2003
Milho	ACN:H ₂ O (1:1)		Plattner, 1999 Voss <i>et al.</i> , 2001
Cereais infantis	MeOH:ACN:H ₂ O (1:1:2)		Visconti <i>et al.</i> , 2001 Lombaert <i>et al.</i> , 2003 Kim <i>et al.</i> , 2003 Sofrizzo <i>et al.</i> , 2001
Cereais infantis	MeOH:ACN:H ₂ O (1:1:2)	C18	Kim <i>et al.</i> , 2003
Tortilla	ACN:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (1:1) pH 3,0		Stack, 1998
Tortilla Milho	ACN:H ₂ O (1:1)		Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999 Plattner, 1999 Chu e Li, 1994
	ACN:H ₂ O (1:1) pH 4,5		Voss <i>et al.</i> , 2001
Tortilla	EDTA 19 a 79,4 mM:MeOH (1:1)		Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999
Milho, ração e outros derivados do milho	MeOH:H ₂ O (3:1)	SAX	Shephard <i>et al.</i> , 1990 Sydenham <i>et al.</i> , 1992a Piñeiro <i>et al.</i> , 1997 Castellá <i>et al.</i> , 1999 Bankole e Mabekeje, 2004
Milho e derivados	MeOH:H ₂ O (70:30)		Shephard <i>et al.</i> , 2000 Castro <i>et al.</i> , 2004
Tortilla	ACN:NaH ₂ PO ₄ (1:1) pH 3,0		Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999
Derivados do milho	ACN:H ₂ O (1:1)		Bittencourt <i>et al.</i> , 2005
Milho e derivados	MeOH:H ₂ O (3:1)	Resinas XAD	Shephard <i>et al.</i> , 1996a
Milho, cereais e outros alimentos	MeOH:H ₂ O (70:30)	–	Shephard <i>et al.</i> , 2000
	MeOH	–	Cirillo <i>et al.</i> , 2003a

A mistura MeOH:H₂O é amplamente utilizada. Porém, enquanto alguns utilizam rácios de 4:1 (Scudamore *et al.*, 1997; 1998; Cortez-Rocha *et al.*, 2003), outros adoptam rácios de 3:1. É o caso de Gelderblom *et al.* (1988) que usaram esta mistura para extrair pela primeira vez FB₁ e FB₂ de culturas de milho contaminadas com *Fusarium moniliforme* MRC 826. Também Shephard *et al.* (1990), ao desenvolverem o primeiro método com LC para a determinação simultânea de FB₁ e FB₂ em milho naturalmente contaminado e em rações, usaram a mesma proporção. Este método foi adoptado pela AOAC Internacional em 1996. Outros autores, como por exemplo Sydenham *et al.* (1992a), Piñeiro *et al.* (1997), Castellá *et al.* (1999), Picco *et al.* (1999) e Bankole e Mabekoje (2004) adoptaram também esta proporção.

Proporções MeOH:H₂O de 70:30 têm sido empregues (Shephard *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2004). Cirillo *et al.* (2003a) usaram apenas metanol na extracção de FB₁ e FB₂ de cereais e de outros alimentos.

A mistura ACN:H₂O (1:1) é também muito usada. Em 1994, Chu e Li utilizaram este solvente de extracção quando associaram a ocorrência de FB₁ e de outras micotoxinas, presentes em milho com bolor, com a alta incidência de EC em algumas regiões da China. Plattner (1999), Voss *et al.* (2001) e Bittencourt *et al.* (2005) também adoptaram a referida mistura.

Segundo alguns autores, a eficácia de extracção da mistura ACN:H₂O é superior quando comparada com MeOH:H₂O, principalmente nos alimentos à base de milho (Solfrizzo *et al.*, 2001; Girolamo *et al.*, 2001), devido à absorção, ligação ou reacções químicas dos ingredientes dos referidos alimentos com as FBs (Solfrizzo *et al.*, 2001).

Outra possibilidade consiste na utilização da mistura MeOH:ACN:H₂O (25:25:50) (Solfrizzo *et al.*, 2001; Visconti *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Lombaert *et al.*, 2003).

Tem-se observado que, em alimentos que durante o seu processamento sofrem nixtamalização (por exemplo, *masa* e *tortillas*), o Ca(OH)₂ usado neste tratamento interfere com a extracção e purificação das FBs. Para se ultrapassar este obstáculo e se conseguir uma extracção completa das FBs é necessário que

o pH do solvente seja ajustado para neutralizar o $\text{Ca}(\text{OH})_2$, que produz extractos com valor de pH superior a 6. Assim, deve-se acidificar os extractos a pH 3 ou 4 adicionando ácido ortofosfórico (H_3PO_4) ou ácido clorídrico (HCl). Preferencialmente, deve-se substituir a água do solvente de extracção por dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) 0,1 M a pH 3,0 para assegurar uma extracção e uma retenção eficientes de todas as FBs (Stack, 1998; Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999; Plattner, 1999; Castro *et al.*, 2004).

Outra opção, com o objectivo de melhorar a extracção de FBs a partir de alimentos tratados com cálcio, consiste em recorrer à mistura EDTA (19 a 79,4 mM de acordo com a concentração de cálcio nas amostras):MeOH (1:1) (Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999).

I.2.2. PURIFICAÇÃO

A purificação permite remover impurezas da matriz e concentrar as FBs (Shephard *et al.*, 1996a). Esta etapa pode ser conseguida recorrendo à extracção em fase sólida (SPE) em fase reversa, usando sílica octadecilgada (C_{18}) (Chu e Li, 1994; Stack, 1998; Kim *et al.*, 2003; Riley *et al.*, 2006) ou troca aniónica (SAX) (Shephard *et al.*, 1990; 2000; Castellá *et al.*, 1999; Bankole e Mabekoje, 2004; Bittencourt *et al.*, 2005). Podem também usar-se colunas de imunoafinidade (IAC) (Scudamore *et al.*, 1998; Cortez-Rocha *et al.*, 2003; Lombaert *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003) e resinas Amberlite XAD (Shephard *et al.*, 1996a). Na Tabela I.5 encontram-se explicitados alguns processos de purificação aplicados à análise de FBs.

A selecção do procedimento de purificação dos extractos das amostras depende do limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) que se pretende atingir. As colunas SAX permitem melhores resultados que as C_{18} para as FBs intactas, no entanto, requerem uma monitorização do pH do extracto da amostra – acima de 5,8 para uma retenção adequada – e um controlo cuidadoso do fluxo de eluição – que não pode ser superior a 1 mL min^{-1} para ser possível a obtenção de recuperações reprodutíveis (Shephard, 1998).

Não obstante, com este protocolo de purificação, as FBs hidrolisadas eluem no volume vazio da coluna, uma vez que não possuem cadeias laterais acídicas, sendo, deste modo, previamente eluídas. As FBs parcialmente hidrolisadas, apenas com uma cadeia lateral acídica, têm um tempo de retenção menor, sendo previamente eluídas. Assim, para quantificar as séries de FBs hidrolisadas e parcialmente hidrolisadas, deve analisar-se o extracto sem proceder à sua purificação, usar um processo de purificação com SAX modificado ou usar um protocolo com C₁₈ (Plattner, 1999).

Relativamente à purificação com colunas C₁₈, têm-se observado variações importantes na percentagem de recuperação obtida. Pensa-se que tal facto se deve à interacção das FBs com os locais activos do adsorvente (Shephard, 1998).

As IAC possuem anticorpos monoclonais que reagem especificamente com as FBs, permitindo uma purificação mais selectiva (Shephard, 1998) (Figura I.4). Os problemas analíticos, em termos de baixas recuperações e purificação insuficiente, que advêm da utilização do método oficial da AOAC Internacional, adoptado em 1996, originalmente desenvolvido por Shephard *et al.* (1990) e que implicava a aplicação de colunas SAX, podem ser ultrapassados com a utilização de IAC (Duncan *et al.*, 1998; Visconti *et al.*, 2001). Deve-se, contudo, assegurar que todos os compostos que se pretendem quantificar reagem com os anticorpos e são retidos na coluna (Plattner, 1999), e, de acordo com as instruções do fabricante, reduzir ao máximo a presença de ACN na coluna, uma vez que este degrada o seu enchimento. Actualmente são amplamente usadas (Plattner, 1999; Voss *et al.*, 2001; Visconti *et al.*, 2001; Sofrizzo *et al.*, 2001; Lombaert *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Cortez-Rocha *et al.*, 2003).

No entanto, a utilização destas colunas pode apresentar alguns problemas, nomeadamente, aquando da análise de matrizes complexas que contêm inúmeros compostos que podem interferir com os seus anticorpos, limitando assim a capacidade da coluna na adsorção do composto em estudo e, por outro lado, a composição das matrizes pode interferir com a estrutura do composto a analisar impedindo a sua extracção e/ou reconhecimento pelos anticorpos (Castegnaro *et al.*, 2006).

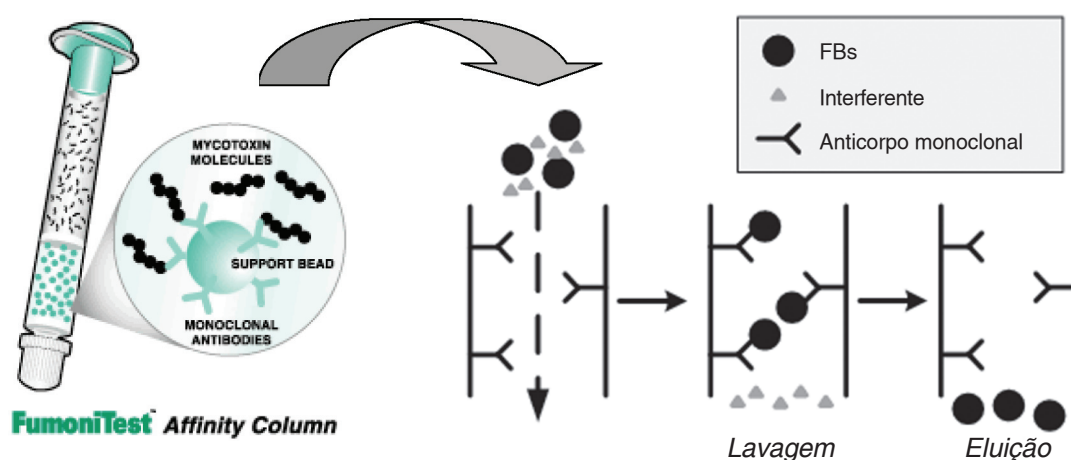


Figura I.4 Esquema representativo da purificação com colunas de imunoafinidade.

I.2.3. DERIVATIZAÇÃO

Como as FBs não possuem nenhum cromóforo e, conseqüentemente, não absorvem luz UV, nem visível, nem apresentam fluorescência nativa, para se conseguir uma detecção com sensibilidade a baixos níveis, necessários para a análise de alimentos contaminados, a derivatização dos extractos das amostras é imprescindível. A reacção de derivatização dá-se entre o reagente derivatizante e a amina primária das FBs. Na maioria dos casos é feita uma derivatização pré-coluna (Thiel *et al.*, 1992; Shephard, 1998; Plattner, 1999). No entanto, a derivatização pós-coluna encontra-se também referenciada (Miyahara *et al.*, 1996; Akyama *et al.*, 1998).

Vários reagentes de derivatização têm sido usados na análise de FBs (Figura I.5).

O primeiro método por LC publicado foi desenvolvido por Gelderblom *et al.* (1988) para a quantificação de FBs presentes em extractos de culturas de *Fusarium moniliforme*, tendo sido obtido, após derivatização com anidrido maleico, um derivado maleilo. Um LOD de $10 \mu\text{g g}^{-1}$ não permitiu, todavia, a sua aplicação na análise de milho naturalmente contaminado, sendo necessária a implementação de técnicas mais sensíveis. (Thiel *et al.*, 1992; Shephard, 1998).

Assim, Shephard *et al.* (1990) utilizaram ortoftaldeído (OPA), na determinação quantitativa de FB₁ e FB₂ em amostras de milho naturalmente contaminado. A tentativa de derivatização com fluorescamina (FLA) não produziu resultados satisfatórios, uma vez que se obtiveram dois picos cromatográficos, devido à formação de dois produtos de reacção. A FLA foi também usada por Ross *et al.* (1991).

O ortoftaldeído é o reagente mais usado na derivatização das FBs, entrando sempre na sua preparação o 2-mercaptoetanol (MCE), usado como agente redutor (Chu e Li, 1994; Voss *et al.*, 2001; Lombaert *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Bankole e Mabekoje, 2004; Castro *et al.*, 2004; Bittencourt *et al.*, 2005). A reacção de derivatização com OPA e MCE é rápida e reproduzível à temperatura ambiente e em tampão borato (pH 9-10), sendo o método aceite pela AOAC Internacional. No entanto, o facto de os produtos da reacção de derivatização serem pouco estáveis conduz a que a intensidade de fluorescência do derivado OPA-FB₁ decresça rapidamente após a derivatização, o que constitui uma desvantagem (Shephard, 1998; Williams *et al.*, 2004). Este problema de estabilidade pode ser solucionado colocando o derivado a 4°C, possibilitando resultados mais consistentes e reproduzíveis, uma vez que as amostras podem ser reanalisadas durante 24 horas, sem perdas significativas na intensidade de fluorescência (Williams *et al.*, 2004). Estes autores concluíram que a instabilidade do complexo OPA-FB₁, OPA-HFB₁ ou de qualquer outra fumonisina poderá ser devida à ausência do grupo hidroxilo no carbono 1, que eventualmente estabilizará a reacção entre o MCE e a OPA no derivado fluorescente.

O naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (NDA) usado com cianeto de potássio forma um derivado fluorescente mais intenso e estável durante 24 horas (Shephard, 1998). Este reagente de derivatização foi utilizado por diversos investigadores (Chu e Li, 1994; Bennett e Richard, 1994; Scott e Lawrence, 1995; Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999; Lombaert *et al.*, 2003).

Em 1994, Chu e Li compararam as percentagens de recuperação ao utilizar OPA e NDA na derivatização de amostras de milho com bolor em regiões da China com alta incidência de EC. Concluíram que com OPA se obtêm percen-

tagens superiores para níveis de toxinas mais elevados e que com NDA se obtêm valores superiores para níveis de toxinas mais baixos. Rammouz *et al.* (2007) também defendem que o LOD observado aquando da derivatização com NDA é geralmente inferior aos obtidos aquando da aplicação de outros métodos, sendo também mais estável.

Outro reagente de derivatização, que também apresenta uma estabilidade limitada, é o 4-fluoro-7-nitrobenzofurano (NBD-F) (Scott e Lawrence, 1992).

Scott e Lawrence (1995) utilizaram na derivatização de FBs, presentes na cerveja, OPA/MCE, NBD-F e NDA/KCN, tendo concluído que OPA/MCE é o melhor reagente de derivatização na análise daquela matriz.

Outro reagente menos usado na derivatização de FBs é o 6-amino-quinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ.Fluor). O sucesso da utilização deste reagente depende da acidez da fase móvel, devendo o metanol ser o solvente de eleição. Neste caso, os derivados são estáveis, pelo menos durante 48 horas, permitindo uma boa resposta a nível de fluorescência (Velásquez *et al.*, 2000).

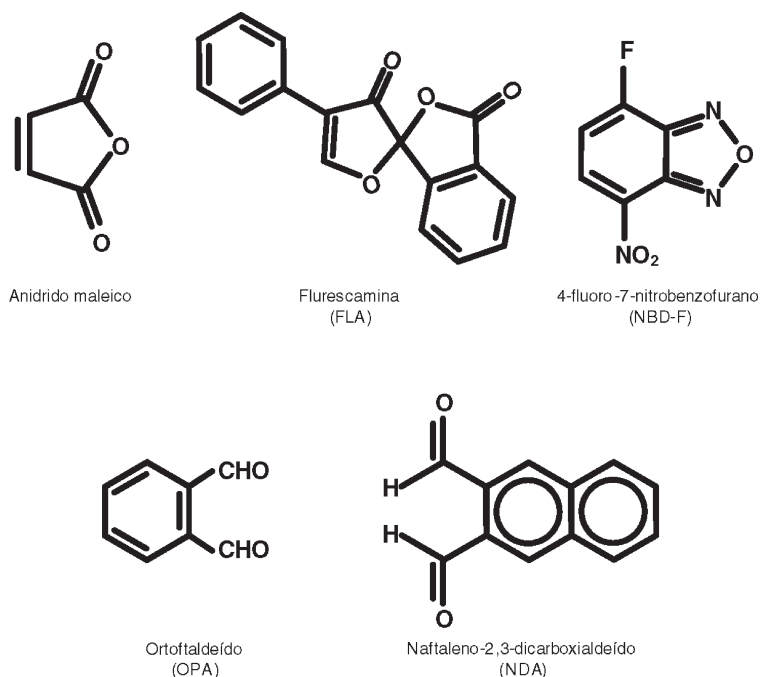


Figura I.5 Estruturas químicas dos reagentes de derivatização mais usados na análise de FBs.

I.2.4. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

I.2.4.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

I.2.4.1.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida (LC) é a técnica analítica de separação mais usada. A razão desta popularidade, além de residir na sua elevada sensibilidade, na sua capacidade para efectuar determinações precisas e de separar espécies não voláteis, deve-se sobretudo ao facto de possuir uma grande aplicabilidade a substâncias com interesse primordial para a indústria e na investigação científica (Skoog *et al.*, 1998).

Uma vez que as FBs são moléculas polares, solúveis em água e em solventes polares, são ideais para a detecção e quantificação por LC em fase reversa.

Shephard *et al.* (1996a) efectuaram uma pesquisa a nível mundial sobre a quantidade de FBs encontradas em milho e em alimentos à base de milho e referiram que mais de 90% dos laboratórios envolvidos neste estudo realizaram uma derivatização pré-coluna e usaram LC para quantificar as referidas micotoxinas.

No que diz respeito ao volume de eluído injectado no sistema cromatográfico, observam-se variações de metodologia para metodologia. Na maioria usa-se um volume de 10 µL (Thiel *et al.*, 1991; Sydenham *et al.*, 1992 a; b; Visconti e Doko, 1994; Doko *et al.*, 1995; Fazekas *et al.*, 1999; Jindal *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003). Em outros utiliza-se 20 µL (Hopmans e Murphy, 1993; Piñeiro *et al.*, 1997; Picco *et al.*, 1999; Bittencourt *et al.*, 2005). Algumas optam por 25 µL (Scott e Lawrence, 1995; Lombaert *et al.*, 2003) enquanto outras por 50 µL (Scott e Lawrence, 1995; Stack, 1998). Um volume de injeção mais elevado proporciona um valor de LOD mais baixo.

No que concerne às colunas analíticas, a maioria dos procedimentos para LC utiliza as de fase reversa C₁₈ para separar as FBs (Shephard *et al.*, 1990; Lombaert *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Bittencourt *et al.*, 2005). Sydenham

et al. (1992 a; b) utilizaram uma coluna analítica de fase reversa, de sílica octaligada (C_8). Em relação à escolha das dimensões da coluna observa-se uma grande disparidade. O comprimento da coluna oscila entre 300 mm (Hopmans e Murphy, 1993) e 100 mm (Piñeiro *et al.*, 1997; Lombaert *et al.*, 2003), passando por 125, 150 e 250 mm (Sydenham *et al.*, 1992a; Lombaert *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003).

O diâmetro interno (d.i.) da coluna é, na maioria dos casos, de 4,6 mm (Kim *et al.*, 2003; Lombaert *et al.*, 2003). Alguns autores adoptam colunas com 3,2; 3,9 e 4 mm de d.i. (Visconti e Doko, 1994; Fazekas *et al.*, 1999; Lombaert *et al.*, 2003).

No que respeita ao tamanho da partícula da fase estacionária, observa-se também alguma variabilidade. A escolha recai preferencialmente para colunas com 5 μ m de tamanho da partícula (Kim *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004; Bittencourt *et al.*, 2005). Contudo, alguns optam por 10 μ m (Tseng e Liu, 1997), 7 μ m (Thiel *et al.*, 1991), 4 μ m (Lombaert *et al.*, 2003), 3 μ m (Stack, 1998; Lombaert *et al.*, 2003) ou 2,5 μ m (Visconti e Doko, 1994).

Dois tipos de eluição são usados, isocrática (Castro *et al.*, 2004; Bittencourt *et al.*, 2005) e gradiente (Scudamore *et al.*, 1997; Lombaert *et al.*, 2003). Uma vez que na maioria dos procedimentos se utiliza cromatografia de fase reversa para separar as FBs, a fase estacionária é apolar e a fase móvel usada é polar (Skoog *et al.*, 1998). Assim, em ambas as eluições os solventes mais utilizados são o metanol, o acetonitrilo e a água, adicionados, por exemplo, de ácido acético ou dihidrogenofosfato de sódio. Verificam-se variações nas misturas utilizadas no que se refere às proporções dos diferentes solventes. O pH das soluções, nalguns casos, é ajustado com ácido ortofosfórico a 3,3 ou 3,35 (Tabela I.6).

Os fluxos adoptados variam também de procedimento para procedimento (Tabela I.7). Porém o fluxo mais utilizado é de 1 mL min^{-1} .

Como as FBs apresentam um comportamento iónico em solução, as separações em colunas de fase reversa são baseadas numa mistura de mecanismos de fase reversa e de troca iónica. Observa-se uma grande variação de

selectividade entre as diferentes colunas. As FBs não eluem convenientemente da maior parte das colunas de fase reversa quando são injectadas com sistemas de solventes neutros e não tamponizados. Para se conseguirem melhores resultados a fase móvel deve ser acídica, o que se consegue através da adição de ácido acético ou fórmico à fase móvel ou pelo uso de um tampão, que para LC-MS deve ser volátil, como o acetato de amónio ou o formato de amónio (Plattner, 1999).

Tabela I.6 Solventes utilizados na fase móvel.

Solventes	Referência
Eluição isocrática	
MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (68:32) ajustado a pH 3,35 com H ₃ PO ₄	Sydenham <i>et al.</i> , 1992a;b
MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (80:20) ajustado a pH 3,3 com H ₃ PO ₄	Thiel <i>et al.</i> , 1991; Tseng e Liu, 1997
MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (80:20) ajustado a pH 3,35 com H ₃ PO ₄	Jindal <i>et al.</i> , 1999; Molinié <i>et al.</i> , 2004
MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (77:23) ajustado a pH 3,3	Piñeiro <i>et al.</i> , 1997
MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (77:23) ajustado a pH 3,35 e com H ₃ PO ₄	Castro <i>et al.</i> , 2004
MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (75:25) ajustado a pH 3,3 com H ₃ PO ₄	Kim <i>et al.</i> , 2003
MeOH:NaH ₂ PO ₄ (76:24) ajustado a pH 3,3	Yoshizawa <i>et al.</i> , 1994
MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (75:25) ajustado a pH 3,35 com H ₃ PO ₄	Doko <i>et al.</i> , 1995; Picco <i>et al.</i> , 1999
MeOH:tampão acetato de sódio ajustado a pH 3,6	Bankole e Mabekoje, 2004
ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (50:50:1)	Stack, 1998; Fazekas <i>et al.</i> , 1999; Bittencourt <i>et al.</i> , 2005
ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (55:45:1)	Chu e Li, 1994
ACN:H ₂ O (99:1) + H ₂ O: CH ₃ COOH (99:1) [65+35]	Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999
ACN:PBS 0,05M, pH 3,3 (39:61)	Hopmans e Murphy, 1993
Eluição em gradiente	
H ₂ O / MeOH; NaH ₂ PO ₄ 0,05M ajustado a pH 3,35 (78:22)	Scudamore <i>et al.</i> , 1997
MeOH:H ₂ O:CH ₃ COOH (77:23:1) / MeOH:CH ₃ COOH (100:1) / H ₂ O	Lombaert <i>et al.</i> , 2003
ACN:H ₂ O (8:2) / MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,05M (55:45) ajustado a pH 3,5 com H ₃ PO ₄	Scott e Lawrence, 1995
ACN / H ₂ O / CH ₃ COOH	Chu e Li, 1994
MeOH:NaH ₂ PO ₄ ajustado a pH 5 com NaOH 2M (1:1) / ACN: H ₂ O (8:2) para NBD-F	Scott e Lawrence, 1995
ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (55:45:1) / ACN:H ₂ O (8:2) para NDA/KCN	Scott e Lawrence, 1995
MeOH:H ₂ O:CH ₃ COOH (77:23:1) / MeOH:CH ₃ COOH (100:1) / H ₂ O	Lombaert <i>et al.</i> , 2003

Tabela I.7 Fluxos utilizados no sistema de LC.

Fluxo (mL min ⁻¹)	Referência
0,5	Lombaert <i>et al.</i> , 2003; Yoshizawa <i>et al.</i> , 1994
0,7	Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999
0,9	Molinié <i>et al.</i> , 2005
1	Bittencourt <i>et al.</i> , 2005; Castro <i>et al.</i> , 2004; Kim <i>et al.</i> , 2003; Stack, 1998; Sydenham <i>et al.</i> , 1992a
1,5	Doko <i>et al.</i> , 1995; Picco <i>et al.</i> , 1999
1→2	Hopmans e Murphy, 1993

A cromatografia líquida com detecção por fluorescência é amplamente usada na análise de FBs em alimentos para consumo humano e animal (Xie *et al.*, 1997). Numerosos investigadores recorrem ao detector de fluorescência (Kim *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004; Bankole e Mabekoje, 2004; Bittencourt *et al.*, 2005; Molinié *et al.*, 2005), enquanto outros usam o espectrofluorímetro (Ross *et al.*, 1991; Visconti e Doko, 1994; Doko *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 2004). Todavia, a determinação de FBs por LC com detecção por fluorescência não dispensa a utilização de reagentes de derivatização, uma vez que, como referenciado anteriormente, se tratam de moléculas sem fluorescência nativa. No entanto, a derivatização pode introduzir variabilidade nos resultados, implicar perdas de amostra e também aumentar o tempo do procedimento analítico (Royer *et al.*, 2004). Por outro lado, como a derivatização das FBs ocorre no grupo amina, este método não permite a detecção das amidas da série P (Musser e Plattner, 1997).

Os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e de emissão (λ_{em}) usados variam de acordo com o reagente de derivatização empregue, tal como se pode observar na Tabela I.8. Dado que o reagente derivatizante mais aplicado é o OPA, os comprimentos de onda mais comuns são 335 nm para a excitação e 440 nm para a emissão.

Tabela I.8 Reagentes derivatizantes/comprimentos de onda usados (nm).

Agente de derivatização	λ (nm)	Referência
OPA	exc=335	Shephard <i>et al.</i> , 1990
	em=440	Chu e Li, 1994
		Kim <i>et al.</i> , 2003
		Bankole e Mabekoje, 2004
		Castro <i>et al.</i> , 2004
		Molinié <i>et al.</i> , 2005
Bittencourt <i>et al.</i> , 2005		
OPA	exc=232	Piñeiro <i>et al.</i> , 1997
	em=425	
NDA	exc=420	Scott e Lawrence, 1995
	em=500	
NDA	exc=280	Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999
	em=470	
NDA	exc=246	Lombaert <i>et al.</i> , 2003 Chu e Li, 1994
	em=418	
NBD-F	exc=460	Scott e Lawrence, 1995
	em=500	
FLA	exc=390	Ross <i>et al.</i> , 1991
	em=475	
AccQ.Fluor	exc=335	Velásquez <i>et al.</i> , 2000
	em=418	

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (MS) e à espectrometria de massa em *tandem* (MS-MS) permite a análise directa e a confirmação das FBs (Xie *et al.*, 1997). Existem vários métodos para a sua determinação por MS e MS-MS, baseados em diferentes tipos de interfaces: *fast atom bombardment* (FAB), *ion spray* (IS), *thermospray* (TS), *liquid secondary ion* (LSI), *electrospray* (ESI) (Xie *et al.*, 1997) e *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI) (Shephard, 1998; Royer *et al.*, 2004).

Em 1997, Xie *et al.* reportaram a detecção de 2 isómeros estruturais da fumonisina B₁ parcialmente hidrolisada (PHFB₁) no milho usando uma técnica de

LC-FAB-MS, obtendo um LOD de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$. A LC-IS-MS e a LC-ESI-MS são métodos aplicados à análise de FBs em culturas de fungos e em amostras naturalmente contaminadas.

Segundo Plattner (1999), a LC-ESI-MS é uma técnica ideal para detectar e quantificar FBs. Estas moléculas tendem a ser iónicas e produzem sinais abundantes tanto no modo iónico positivo como no modo iónico negativo. Esta técnica tem, aliás, sido utilizada por diferentes autores na quantificação destas micotoxinas (Musser e Plattner, 1997; Plattner, 1999; Cirillo *et al.*, 2003a; Zollner e Mayer-Helm, 2006).

Ao comparar a interface TS com a interface ESI, conclui-se que a última permite quantificar FBs na ordem dos nanogramas, providenciando um sinal forte para a molécula iónica e uma pequena fragmentação. Ao contrário, a TS-MS conduz a múltiplos fragmentos iónicos e não apresenta sensibilidade a níveis inferiores ao micrograma (Shephard, 1998). Contudo, recentemente foi descrito um método para a determinação da FBs no milho, por LC-TS-MS, no modo de ião negativo, apresentando um LOD da ordem dos 2 ng. Outros autores aplicaram a interface *particle beam* (PB), para a confirmação das FBs. A vantagem que esta técnica apresenta é a capacidade de proporcionar espectros de electrões e de ionização química, os quais permitem obter uma maior informação estrutural relativamente às técnicas de ionização à pressão atmosférica, tais como *electrospray* (Royer *et al.*, 2004).

A quantificação e respectiva confirmação por LC-ESI-MS ou LC-ESI-MS-MS em diferentes matrizes têm apresentado LODs que variam entre $0,8$ a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. No caso do milho, o LOD obtido, para a FB₁, foi de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, quando a LC-APCI-MS foi aplicada (Royer *et al.*, 2004).

I.2.4.1.2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA

O primeiro método que aplicou a cromatografia em camada fina (TLC) na determinação de FBs foi desenvolvido durante o isolamento destas micotoxinas a partir de culturas de *Fusarium moniliforme* MRC 826 em milho, com o

objectivo de monitorizar os eluídos das colunas. O método envolvia TLC em fase reversa em placas com sílica C_{18} modificada, usando como solvente MeOH:H₂O (3:1), e também TLC em fase normal em placas de sílica, usando como solvente uma mistura de CHCl₃:MeOH:H₂O:CH₃COOH. Finalmente, as FBs eram visualizadas através da pulverização com soluções de ninhidrina ou *p*-anisaldeído (Gelderblom *et al.*, 1988). Esta técnica foi também utilizada por Cawood *et al.* (1990), Sydenham *et al.* (1990), Ross *et al.* (1991), Plattner *et al.* (1992) e Tseng e Liu (1997).

Apesar de útil para monitorizar os efluentes das colunas e analisar culturas de fungos, o LOD do método, na ordem de 0,5 mg g⁻¹, não permite a sua aplicação, com sucesso, na determinação de FBs em milho naturalmente contaminado (Sydenham *et al.*, 1990).

O LOD do método foi reduzido a 0,1 mg g⁻¹ com a utilização de um processo de desenvolvimento sequencial em duas fases da placa de sílica, em que a secção inferior da placa era removida entre as duas fases e as FBs eram quantificadas através de um espectrofotodensitómetro, após pulverização com solução de *p*-anisaldeído (Shephard, 1998).

A utilização de fluorescamina como reagente revelador para visualizar as FBs com luz UV melhorou a sensibilidade, obtendo-se um LOD de 0,1 µg g⁻¹, e a selectividade do método e possibilitou o seu uso na análise de milho naturalmente contaminado (Shephard, 1998).

Recentemente, Shephard e Sewram (2004) realizaram um estudo colaborativo para a determinação de FB₁ em milho, através da aplicação de TLC em fase reversa.

I.2.4.1.3. CROMATOGRAFIA GASOSA

O desenvolvimento inicial de metodologias analíticas aplicadas à análise de FBs recorreu a técnicas de cromatografia gasosa (GC) com detector de ionização de chama GC-FID (Sydenham *et al.*, 1990). Em 1990, Sydenham *et al.* mostraram a evidência da ocorrência natural de FB₁ no milho usando

diferentes técnicas, entre as quais, GC capilar. A técnica envolveu a hidrólise ácida das FBs, de modo a promover a rotura das ligações éster e subsequentemente detectar os grupos de ácidos tricarbóxicos (TCA) resultantes, após a sua esterificação com isobutanol. A confirmação dos TCA nas amostras hidrolisadas foi conseguida por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS). Os procedimentos que utilizam GC têm a vantagem de se poderem combinar facilmente com MS para confirmação de resultados.

Plattner *et al.* (1990) referiram um método mais directo para a determinação de FBs em que o esqueleto aminopentol das FBs, produzido por hidrólise alcalina, foi isolado através de uma resina de troca iónica e depois convertido em um derivado trimetilsililado para análise por GC. Este método, usando MS com ionização química (APCI) ou ionização eléctrica (ESI), foi aplicado para determinar quantitativamente a presença de FB₁ em amostras de milho altamente contaminado e associado a casos de ELEM.

Em 1991, Ross *et al.* também analisaram algumas amostras, por GC-MS, para determinar a concentração de FB₁ em rações associadas a doenças em animais.

A metodologia GC-MS é mais demorada e requer instrumentação dispendiosa, e por esta razão não é apropriada nem prática para se efectuar a análise de um grande número de amostras (Sydenham *et al.*, 1992a). Por outro lado, o procedimento de GC-MS de Plattner *et al.* (1990) não apresenta a sensibilidade necessária. Este método pode, contudo, ser aplicado para quantificar níveis elevados de FBs que ocorrem, por exemplo, em amostras de rações associadas a ELEM (Thiel *et al.*, 1992).

I.2.4.2. OUTROS MÉTODOS

I.2.4.2.1. IMUNOLÓGICOS

As FBs, como anteriormente foi referido, são detectáveis por TLC, LC-FD, GC-FID, GC-MS e LC-MS. No entanto, ocorrem, por vezes, problemas quando, dada a sua complexidade se analisam matrizes alimentares e tecidos. As inter-

ferências encontradas podem ultrapassar-se recorrendo a métodos de purificação. Contudo, o resultado final implica um procedimento mais moroso e dispendioso que pode, ocasionalmente, limitar o número de amostras a analisar diariamente. Para obviar este problema, a indústria alimentar usa ensaios imunológicos em virtude da sua relativa simplicidade, boa reprodutibilidade, e elevada sensibilidade, devido à especificidade das reacções antigénio-anticorpo, associada a custos menos onerosos e ao uso de equipamentos não sofisticados, como o método ELISA, para fazer o *screening* de micotoxinas. Este procedimento apresenta, contudo, a desvantagem de não distinguir e quantificar resíduos múltiplos, sendo necessárias diversas análises individuais para determinar as diferentes micotoxinas (Abouziied e Pestka, 1994).

Ensaio imunológico mostram-se ferramentas úteis, complementares dos métodos físico-químicos, para analisar micotoxinas em alimentos. Anticorpos mono e policlonais têm sido produzidos para reagir contra as FBs (Schneider *et al.*, 1995).

Azcona-Oliveira *et al.* (1992) reportaram a produção de anticorpos monoclonais para as fumonisinas B₁, B₂ e B₃, procedendo depois a um *screening* com ELISA para quantificar as referidas moléculas em rações, tecidos e amostras biológicas. O LOD para a FB₁ foi de 50 ng mL⁻¹.

I.2.4.2.2. ELECTROFORÉTICOS

Apesar da sua aplicação não ser muito difundida, pode-se recorrer à electroforese capilar de zona (CZE) para a determinação de FBs. A natureza aniónica das FBs poderá implicar a migração electroforética através do ânodo. No entanto, com capilares de sílica fundida, o fluxo electro-osmótico do tampão através do cátodo é suficiente para transportar as FBs na reacção (Maragos, 1995). A primeira aplicação da CZE na análise de FBs foi feita por Maragos, em 1995. Pelo facto de possuírem dois grupos de ácidos tricarbóxicos que podem adquirir carga negativa (Maragos *et al.*, 1996), as FBs têm potencial para a separação através desta técnica e detecção por fluorescência induzida por

laser (CZE-LIF). Maragos (1995) defendeu que a sensibilidade do método é mais elevada que a conseguida com LC. Os LODs encontrados para a FB₁ foram de 0,025 pg para a CZE e 0,8 ng por LC. Advogou ainda que a CZE permite a utilização de um volume mais pequeno de amostra e produz volumes de solventes perigosos consideravelmente inferiores (Maragos, 1995).

Um dos grandes inconvenientes desta técnica reside no facto de que qualquer ligeira alteração na composição do tampão tem efeitos dramáticos na separação e migração das FBs (Maragos, 1995).

I.2.5. CONFIRMAÇÃO

A confirmação das amostras positivas é essencial para assegurar a qualidade da análise (Valenta, 1998).

Em 1991, Thiel *et al.* confirmaram a produção de FB₁ e FB₂ por culturas de diferentes espécies de *Fusarium* em milho, utilizando LC-FD com derivatização por OPA e GC-MS com derivatização por trifluoroacetilimidazole.

Ross *et al.* (1991) e Shephard *et al.* (1996a) confirmaram a presença de FBs em rações associadas a problemas animais e em milho, usando TLC e GC-MS. A GC-MS foi também a técnica escolhida por Plattner *et al.* (1992) para confirmar a presença de FBs em culturas de *Fusarium moniliforme*.

Pittet *et al.* (1992) procederam à confirmação de FB₁ em produtos à base de milho do mercado suíço aplicando uma técnica de *high performance thin layer chromatography* (HPTLC).

A LC-MS com ionização por *electrospray* é a técnica hoje em dia mais usada na confirmação de amostras positivas (Castellá *et al.*, 1999; Voss *et al.*, 2001), embora muitas outras interfaces possam ser utilizadas, com sensibilidade adequada, permitindo simultaneamente a determinação e confirmação de FBs em distintas matrizes alimentares, como se referiu anteriormente.

CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO ÀS FUMONISINAS: BIOMARCADORES E METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A SUA DETERMINAÇÃO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

- II.1. Fumonisinias
 - II.1.1. Fluidos biológicos e fezes
 - II.1.2. Tecidos
- II.2. Razão esfinganina/esfingosina (Sa/So)
 - II.2.1. Fluidos biológicos
 - II.2.2. Tecidos
- II.3. Metodologias analíticas para a determinação de fumonisinias em amostras biológicas
 - II.3.1. Extração
 - II.3.2. Purificação
 - II.3.3. Derivatização
 - II.3.4. Detecção e quantificação
 - II.3.4.1. Cromatografia líquida
 - II.3.4.2. Cromatografia em camada fina
 - II.3.4.3. Métodos radioactivos
 - II.3.4.4. Métodos imuno-histoquímicos – sistema avidina-biotina-peroxidase
- II.4. Metodologias analíticas para a determinação da proporção esfinganina/esfingosina em amostras biológicas
 - II.4.1. Extração
 - II.4.2. Purificação
 - II.4.3. Derivatização
 - II.4.4. Detecção e quantificação
 - II.4.4.1. Cromatografia líquida
 - II.4.4.2. Cromatografia em camada fina e métodos radioactivos

Para evitar a ocorrência dos efeitos adversos mencionados no Sub-capítulo I.1.4. existe uma necessidade premente de limitar a exposição às FBs, assegurando a qualidade dos alimentos destinados ao consumo humano, mas também a produtividade animal que apresenta uma importância económica extrema. A possibilidade da transmissão de micotoxinas através de produtos de origem animal ingeridos pelos consumidores é preocupante (Prelusky *et al.*, 1996).

Consequentemente é importante determinar a respectiva contaminação, de modo a garantir a saúde pública (Prelusky *et al.*, 1996), e fundamental o desenvolvimento de métodos eficientes para analisar alimentos e monitorizar a exposição humana recorrendo ao uso de biomarcadores apropriados (Chelule *et al.*, 2000).

Apesar de os resultados obtidos a partir do cálculo da ingestão diária com base na análise de alimentos e em tabelas de consumo serem úteis numa primeira etapa, revelam-se pouco precisos (Crews *et al.*, 2001). Para obstar esta situação, a avaliação da exposição das populações às FBs consiste em avaliar os níveis de FBs ou de outros biomarcadores, como a razão esfinganina/ /esfingosina (Sa/So), em fluidos biológicos e tecidos, que podem constituir uma medida mais correcta da exposição às referidas micotoxinas (Shetty e Bhat, 1998; Solfrizzo *et al.*, 1997; Turner *et al.*, 1999).

Muitas das dificuldades que surgem aquando da utilização de biomarcadores decorrem da necessidade de determinar alterações após exposições de longa duração e a baixas concentrações de certos componentes da dieta. Sendo os biomarcadores usados como indicativos de possíveis alterações sistémicas e funcionais em órgãos, tecidos, células e estruturas sub-celulares para monitorizar a exposição de indivíduos e populações a determinados compostos, eles devem ser específicos, sensíveis e recorrer a técnicas pouco invasivas, principalmente no caso dos humanos (Crews *et al.*, 2001).

A urina é um indicador para monitorizar a exposição das populações às FBs, tendo sido já demonstrada a sua excreção através deste fluido biológico por estudos toxicocinéticos (Shetty e Bhat, 1998).

A determinação da proporção Sa/So, em fluidos biológicos, também permite avaliar a exposição à FB₁, uma vez que esta provoca uma acumulação de Sa livre e um aumento da proporção Sa livre/So livre, por inibição das enzimas esfingosina e esfinganina N-aciltransferase (Solfrizzo *et al.*, 1997; Castegnaro *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 1999).

Esta é uma área em que o nosso país não tem investido, apesar das preocupações subjacentes em países do continente europeu (Piñeiro *et al.*, 1997; Solfrizzo *et al.*, 1997), americano (Rheeder *et al.*, 1992; Westhuizen *et al.*, 2003), africano (Sydenham *et al.*, 1991; Waalwijk *et al.*, 2008) e asiático (Chu e Li, 1994; Shephard *et al.*, 2000) em consequência da correlação encontrada entre a presença de elevados teores das referidas FBs nos alimentos e o seu aparecimento na urina (Shetty e Bhat, 1998) e uma proporção elevada de Sa/So, bem como com o aparecimento de EC (Solfrizzo *et al.*, 1997; Turner *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003).

Os métodos usados na monitorização da exposição humana através do uso de biomarcadores apropriados devem ter em conta a toxicinética, modo de acção e metabolismo potencial das micotoxinas em estudo (Shephard *et al.*, 2007).

Na determinação de FBs em amostras biológicas, a grande maioria dos métodos referenciados envolve extracção, recorrendo a misturas de solventes polares, seguida de um processo de purificação com extracção em fase sólida (SPE) com colunas de fase reversa (C₁₈) (Shephard *et al.*, 1995a; b; Chelule *et al.*, 2000), cartuchas de troca aniónica forte (SAX) (Shephard *et al.*, 1992a; Sewram *et al.*, 2003) e com resina polimérica não iónica Amberlite XAD-2 em mistura com SAX (Shetty e Bhat, 1998). Na análise de Sa e de So as amostras são sujeitas a extracção, seguida ou não de um processo de purificação com extracção em fase sólida (SPE) com sílica gel (Riley *et al.*, 1994b; Solfrizzo *et al.*, 1997).

Após derivatização com ortoftaldeído (OPA), usado na maior parte dos casos (Shephard *et al.*, 1992a; Riley *et al.*, 1994b; Solfrizzo *et al.*, 1997; Sewram *et al.*, 2003) ou outro agente de derivatização como o naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (NDA) (Cho *et al.*, 2002), a detecção e quantificação de ambos os biomarcadores são efectuadas recorrendo, principalmente, a métodos cromatográficos, sendo a cromatografia líquida (LC) com detecção fluorimétrica (LC-FD) (Shephard *et al.*, 1992a; Riley *et al.*, 1994b; Shephard e Snijman, 1999; Chelule *et al.*, 2000; Qui e Liu, 2001) a mais utilizada. A detecção por espectrometria de massa (LC-MS) (Meyer *et al.*, 2003; Sewram *et al.*, 2003) tem como vantagem não requerer derivatização. A cromatografia em camada fina (TLC) (Chelule *et al.*, 2000), os métodos imuno-histológicos (Buim *et al.*, 1999) e os radioactivos (Prelusky *et al.*, 1996) são também reportados, embora menos usados.

II.1. FUMONISINAS

Um número apreciável de publicações científicas tem revelado a preocupação da comunidade científica internacional em avaliar os níveis de FBs em fluidos biológicos, fezes e tecidos.

Para avaliar a exposição às FBs em animais e no Homem são usados distintos fluidos biológicos (urina, plasma e bÍlis) bem como fezes e tecidos (Prelusky *et al.*, 1996; Shetty e Bhat, 1998; Chelule *et al.*, 2000; Sewram *et al.*, 2001; 2003; Meyer *et al.*, 2003).

Os resultados de estudos de toxicinética indicam que a FB₁ apresenta uma diminuta biodisponibilidade oral em ratos, suínos, aves, bovinos e macacos (Sewram *et al.*, 2003; Fodor *et al.*, 2006). As características hidrofílicas das FBs contribuem para a sua rápida eliminação dos tecidos animais (Buim *et al.*, 1999). A reduzida biodisponibilidade da FB₁ deve-se sobretudo à sua fraca absorção e também à sua eliminação pelo efeito de primeira passagem no fígado após a sua absorção. A dúvida persiste em saber se a reduzida absorção e, conseqüentemente, reduzida biodisponibilidade, se deve ao facto do transporte através do epitélio intestinal ser pobre ou ao facto de existir uma forte associação entre as FBs e o conteúdo intestinal (Shephard e Snijman, 1999). Enquanto

que Angelis *et al.* (2005) concluem que a FB₁ não atravessa a barreira epitelial do intestino, não alterando por isso a sua integridade, Loiseau *et al.* (2007) defendem que uma exposição prolongada à FB₁ pode aumentar o respectivo fluxo trans-epitelial. Pensa-se que o facto de a FB₁ ser polianiónica, pela presença de aniões carboxilos em C₁₄ e C₁₅, pode interferir na sua própria absorção ao ligar-se a catiões como o sódio, o potássio e a grandes moléculas necessárias para o transporte activo através da membrana intestinal. Os policatiões inibem o transporte activo de moléculas como açúcares e aminoácidos através da membrana intestinal de ratos (Elsenhans *et al.*, 1983).

Hopmans *et al.* (1997) verificaram que uma pequena porção de FB₁ é absorvida para a corrente sanguínea na sua forma intacta. No entanto, a absorção aumenta quando, por hidrólise, a molécula perde um ou os dois grupos de ácido tricarboxílico. Este facto pode explicar a maior toxicidade da PHFB₁ e HFB₁ relativamente à FB₁.

Segundo Shephard *et al.* (2007), a FB₁ não sofre nenhuma metabolização significativa uma vez que a sua incubação em culturas de hepatócitos primários de rato e em fracções sub-celulares de enzimas não produziu metabolitos detectáveis. Por outro lado, a FB₁ foi recuperada inalterada na urina e bÍlis de animais tratados com a referida fumonisina. Alguns produtos hidrolisados de FB₁, sobretudo a HFB₁, foram encontrados no intestino e fezes de macacos *vervet*. No entanto estes compostos não representam produtos metabólicos que pudessem ser úteis como biomarcadores.

Assim, e dada a ausência de metabolitos mensuráveis, as próprias FB₁ e FB₂ foram consideradas como biomarcadores e metodologias analíticas para a sua determinação em diversas amostras biológicas foram desenvolvidas (Shephard *et al.*, 2007).

II.1.1. FLUIDOS BIOLÓGICOS E FEZES

A determinação da FB₁ em fluidos biológicos (plasma e urina) foi referenciada por Shephard *et al.* (1992a) dois anos após a sua determinação em milho da região de Transkei, na África do Sul, e cuja população humana apresentava

alta incidência de EC (Sydenham *et al.*, 1990). A urina é uma matriz biológica útil para monitorizar a exposição das populações às FBs, tendo sido já demonstrada a excreção destas toxinas através deste fluido biológico (Shetty e Bhat, 1998).

De acordo com Chelule *et al.* (2000) a pesquisa de FB₁ em plasma é impraticável dada a sua fraca absorção e rápida eliminação pelo tubo digestivo, factos que conduzem à sua baixa concentração neste fluido biológico como foi constatado em suínos por Prelusky *et al.* (1996) e Meyer *et al.* (2003). Por outro lado, aparentemente, a FB₁ não forma conjugados com o DNA nem com proteínas plasmáticas, como a albumina, tal como acontece por exemplo, com a aflatoxina B₁ (Chelule *et al.*, 2000).

No estudo realizado por Prelusky *et al.* (1996) em suínos aos quais foi administrada por via oral FB₁ marcada com ¹⁴C, foi detectada radioactividade na bÍlis, o que confirma que existe alguma absorção desta toxina. Meyer *et al.* (2003) encontraram níveis elevados (358 µg kg⁻¹) de FB₁ na bÍlis dos suínos estudados. Estes dados confirmam que a FB₁ é eliminada essencialmente por via hepática (Prelusky *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 2003). Os estudos realizados em primatas não-humanos e outros animais permitiram concluir que apenas 1% da dose administrada é absorvida, o que parece explicar o facto de que seja necessária a exposição (por ingestão) a doses elevadas (superiores a 5 mg kg⁻¹) para obter concentrações tecidulares passíveis de produzirem sintomas de doença (Chelule *et al.*, 2000).

Como as FBs são fracamente absorvidas e a maior parte da porção absorvida é excretada através da bÍlis é sensato pesquisar FBs e produtos resultantes da sua degradação em fezes. Outra vantagem na análise desta matriz resulta do facto de poder ser recolhida por rotina nos hospitais, sem necessidade de sujeitar os doentes a técnicas invasivas (Chelule *et al.*, 2000).

Shephard *et al.* (1992b) administraram FB₁ marcada com ¹⁴C a ratos e avaliaram o seu percurso no organismo. Aparentemente a FB₁ não sofre biotransformações significativas sendo eliminada, em 24 horas, maioritariamente através das fezes onde foi detectada cerca de 80% da radioactividade, detectando-se níveis vestigiais na urina.

Segundo Prelusky *et al.* (1996) a eliminação da toxina através das fezes e urina de suínos Yorkshire barrow, durante os 3 dias que se seguiram à primeira administração de rações contaminadas, foi baixa – cerca de 35% do total consumido. Após este período inicial verificou-se um aumento rápido na eliminação da FB₁ atingindo-se os 85% no final da experiência, que decorreu durante 33 dias. A eliminação por via urinária contribuiu apenas com 0 a 2,5% do total recuperado. A excreção urinária não é portanto a principal via de eliminação da FB₁.

Chelule *et al.* (2000) avaliaram a presença de FB₁ em fezes de crianças em idade escolar de zonas rurais e urbanas da África do Sul. Verificaram que 35% das amostras provenientes de crianças de zonas rurais eram positivas para a presença de FB₁. Não é contudo possível estabelecer uma relação entre os valores encontrados e os teores de FB₁ que possam ser consumidos diariamente. Certamente, as populações rurais terão níveis de exposição mais elevados do que as urbanas, já que consomem produtos naturais à base de milho que não estão sujeitos a qualquer controlo. Constata-se assim que a determinação das quantidades de FB₁ em fezes pode constituir um biomarcador de exposição à micotoxina, mas durante um período de tempo curto após essa mesma exposição. Por outro lado, dada a natureza desta matriz, a sua recolha e utilização em estudos de ampla escala não permite uma aplicação que se possa considerar prática (Shephard *et al.*, 2007).

Segundo Shephard e Snijam (1999), a FB₂, tal como a FB₁, apresenta uma biodisponibilidade baixa. Em experiências realizadas com macacos vervet [macacos-de-gibraltar ou macaco verde africano] (*Cercopithecus aethiops*) verificou-se que, após a administração intravenosa de 2 mg de FB₂ kg⁻¹ massa corporal, a micotoxina foi rapidamente removida do plasma. Para tal contribuiu uma fase inicial de distribuição e uma fase seguinte de eliminação, esta com um tempo de semi-vida de 18 minutos. Aparentemente, a FB₂ apresenta uma biodisponibilidade ainda mais reduzida do que a FB₁. Após administração intravenosa, a excreção de FB₂ por via urinária foi extremamente baixa. Apenas 4,1% da dose administrada por via intravenosa e 0,2% da dose administrada por via oral foram recuperadas na urina, durante um período de 7 dias após a exposição. Já a comparação entre a excreção urinária de FB₁ e de FB₂, em

ratos, havia mostrado que a segunda é eliminada em menor percentagem por via renal do que a FB_1 (Shephard e Snijman, 1999). Parece assim que a via predominante para a excreção desta micotoxina intacta ou parcialmente hidrolisada é a via biliar.

Os factores que determinam a via de eliminação de xenobióticos são o peso molecular e a solubilidade em água. Pesos moleculares mais baixos e maior hidrossolubilidade favorecem a eliminação por via renal em detrimento da via biliar. Apesar de tanto a FB_1 como a FB_2 apresentarem excreção renal diminuta, a excreção da FB_2 por esta via é ainda menor, facto que pode, provavelmente, ser explicado pela diferença observada entre polaridade das mesmas. Assim, a FB_1 , que apresenta maior polaridade, experimenta maior excreção renal, relativamente à FB_2 , apesar da sua massa molecular ser ligeiramente mais elevada. A excreção extremamente reduzida de FB_2 , após administração oral, através da urina reflecte a limitada biodisponibilidade da toxina, uma vez que apenas pequenas quantidades atingem a circulação sanguínea, verificando-se ainda predominância da via biliar sobre a via renal no seu processo de eliminação (Shephard e Snijman, 1999).

Tal como foi referido para a FB_1 , a maior parte da dose de FB_2 administrada por via oral ou por via intravenosa é recuperada nas fezes nas formas intacta (FB_2), hidrolisada (HFB_2) ou parcialmente hidrolisada ($PHFB_2$). Destes três componentes, as quantidades relativas de FB_2 e $PHFB_2$ variam largamente, enquanto que a HFB_2 aparece em pequenas quantidades. Considerando a sua reduzida biodisponibilidade, a FB_2 , tal como a FB_1 , sofrerá assim hidrólise no intestino por acção de esterases ou por acção de microrganismos, que predominantemente removem um dos dois grupos de ácido tricarboxílico (Shephard e Snijman, 1999; Fodor *et al.*, 2007). Apesar destes produtos de hidrólise constituírem uma porção substancial da dose de FB_2 recuperada nas fezes, não foi detectada a sua presença na urina (Shephard e Snijman, 1999).

Tal como para a FB_1 , também para a FB_2 não é possível recuperar completamente a dose administrada. O metabolismo das FBs no tubo digestivo poderá, no entanto, explicar estas perdas (Shephard e Snijman, 1999).

II.1.2. TECIDOS

Tendencialmente a FB₁ acumula-se em tecidos específicos do organismo dos animais, particularmente, no fígado e nos rins. Esta tendência foi confirmada por estudos realizados em suínos que foram alimentados com rações contaminadas com FB₁ (Prelusky *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 2003).

Em 1996, Prelusky *et al.* alimentaram suínos, durante 12 dias com ração contaminada com FB₁ marcada com ¹⁴C. As doses administradas foram diminuindo ao longo do tempo, sendo a dose máxima inicial de 3,0 mg kg⁻¹ de peso vivo. Vinte e quatro dias após o início da experiência os animais foram alimentados com ração não contaminada. Não foram detectadas (LOD = 11,5 ng g⁻¹) quaisquer concentrações de FB₁ em amostras de baço, músculo, cérebro, glândulas adrenais, tecido adiposo e pele. Foram encontradas quantidades vestigiais (11,5 ng g⁻¹ a 18,4 ng g⁻¹) nos pulmões, coração e ossos. No fígado e rim a radioactividade foi detectada 3 dias após o início da experiência. Nestes tecidos, os níveis de radioactividade aumentaram com a ingestão continuada da dieta contaminada com FB₁. A acumulação de radioactividade cessou logo que os animais passaram a ser alimentados com ração não contaminada. Contudo, 9 dias após o fim da administração de FB₁ ainda era possível encontrar níveis vestigiais, acima do limite de detecção de radioactividade. O ciclo enterohepático pode ter um papel importante no protelar da eliminação total da FB₁.

Meyer *et al.* (2003) procederam à administração oral a suínos com 12 a 14 kg de peso vivo, de 100 mg de FB₁/animal/dia, durante 5 a 11 dias. As concentrações de FB₁ foram determinadas, por LC-MS (LOD = 1,5 ng g⁻¹), em diversas amostras de tecidos. Os autores verificaram que todas as matrizes analisadas apresentavam quantidades detectáveis de FB₁. As concentrações médias encontradas foram particularmente elevadas no baço (854 µg kg⁻¹), rim (824 µg kg⁻¹), fígado (231 µg kg⁻¹) e pulmão (170 µg kg⁻¹). Foi, contudo, observada uma grande variabilidade nos valores da concentração de FB₁ nos mesmos tecidos para diferentes animais. Tal pode dever-se à variação analítica, mas também e sobretudo a diferenças individuais, nomeadamente a capacidade individual de absorção

e de metabolização da FB₁ bem como a distribuição heterogénea da micotoxina em cada um dos órgãos. É de notar que o metabolismo e a farmacocinética da toxina podem estar alterados pelas elevadas doses administradas.

Recentemente, alguns autores têm avaliado as concentrações de FBs em faneras, como o pêlo de ratos e de macacos vervet (*Cercopithecus aethiops*) e cabelo de humanos, para prever o nível de exposição às toxinas. Sendo a recolha destas matrizes uma técnica não invasiva e observando-se nelas a acumulação destas micotoxinas, a sua utilização será mais vantajosa quando comparada com outras matrizes (Sewram *et al.*, 2001; 2003).

A popularidade da utilização de cabelo na avaliação de exposição a substâncias tóxicas tem vindo a aumentar nas últimas décadas. Este interesse deve-se sobretudo à facilidade na obtenção de amostras e, de acordo com o comprimento do cabelo, à possibilidade de avaliar a eventual exposição durante períodos de tempo mais longos. Este facto acompanhado do progresso das técnicas de separação, bem como da selectividade e sensibilidade dos métodos analíticos de detecção, tornou possível a detecção de xenobióticos em cabelo na ordem dos pmol mg⁻¹ (Sewram *et al.*, 2003).

Em 1992, quando se estudou a relação entre a contaminação do milho por *Fusarium moniliforme* e FBs e a elevada incidência de cancro esofágico em vários distritos da região de Transkei (África do Sul), obteve-se um valor de 13,8 µg de FB₁ kg⁻¹ de peso corporal (considerando um adulto de 70 kg que consuma 460 g de milho/dia) para a ingestão diária provável (PDI) (Rheeder *et al.*, 1992). No estudo realizado por Sewram *et al.* (2003) em amostras de cabelo de pessoas oriundas da mesma região concluiu-se que a PDI era de 20,4 µg de FB₁ kg⁻¹ de peso corporal. A diferença entre estes valores dever-se-á ao consumo de outros alimentos contaminados. Para estimar correctamente a exposição humana à FB₁ através da alimentação é necessário que a informação relativa ao consumo de diversos alimentos, e não apenas o milho, esteja disponível. A análise da matriz cabelo permite medir a exposição cumulativa às FBs, independentemente das fontes de contaminação que podem ser extremamente variáveis.

No entanto, a avaliação do nível de FBs no cabelo requer uma consideração atenta de factores como a deposição passiva de esporos fúngicos, possíveis alterações induzidas por tratamentos cosméticos e a disposição das toxinas ao longo do cabelo (Sewram *et al.*, 2003). Estes autores verificaram que a quantidade de FBs detectada pode variar consideravelmente de amostra para amostra, podendo este facto dever-se a uma variabilidade interindividual, uma vez que os factores que afectam a análise de xenobióticos no cabelo são heterogéneos, incluindo-se o crescimento e a cor do cabelo, a etnia, a idade e o sexo do indivíduo, e ainda a biodisponibilidade e o metabolismo das toxinas. Apesar destes factores poderem interferir com a quantificação de FB₁ nesta matriz, é possível efectuar uma avaliação qualitativa da exposição. A presença de interferentes pode ser ultrapassada usando uma metodologia por MS-MS que permite uma maior especificidade na análise.

II.2. RAZÃO ESFINGANINA/ESFINGOSINA (Sa/So)

O mecanismo de acção das FBs está relacionado com a sua interferência com o metabolismo da esfingosina – esfinganina (So-Sa) (Cirillo *et al.*, 2003a), perturbando o metabolismo dos esfingolípidos (Figura II.1) (Turner *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 2005).

Os níveis reduzidos de FBs no plasma e o seu rápido declínio após a exposição, bem como o insucesso de todos os estudos em detectar quantidades significativas de analitos circulantes, mostram que estes parâmetros não são adequados para serem utilizados como biomarcadores quando a exposição a estas toxinas é reduzida. Contudo, a observação de que a FB₁ e a FB₂ inibem a enzima N-aciltransferase (ceramida sintetase) na biossíntese *de novo* de esfingolípidos levando a uma acumulação de Sa, uma base esfingóide, e a um aumento da razão Sa/So sugere que o valor desta razão poderá ser um biomarcador potencial e preferencial relativamente à exposição às FBs (Shephard e Snijam, 1999).

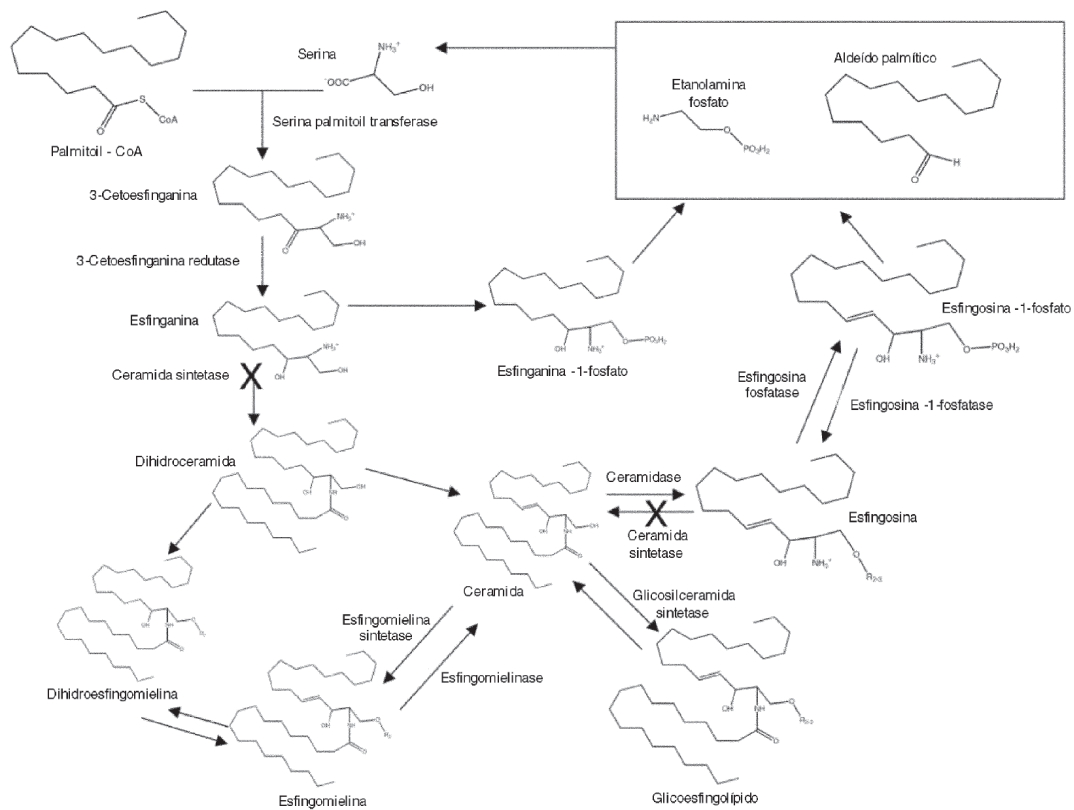


Figura II.1 Mecanismo da biossíntese *de novo* dos esfingolípidos em células animais (o símbolo **X** significa bloqueio da reacção; adaptado de Soriano *et al.*, 2005).

O facto da estrutura das FBs ser análoga da estrutura da Sa e da So torna-as potentes inibidores competitivos da Sa N-aciltransferase e da So N-aciltransferase (ceramida sintetase) (Figura II.2) que são elementos chave para a via metabólica da biossíntese *de novo* dos esfingolípidos e *turnover* dos mesmos, tal como se referiu no Sub-capítulo I.1.3.

Assim, podem alterar a concentração e a razão entre a Sa e a So, diminuindo a biossíntese de So e promovendo a acumulação de Sa (Figura II.1) (Riley *et al.*, 1994b; Turner *et al.*, 1999; Desai *et al.*, 2002; Carratù *et al.*, 2003; Soriano *et al.*, 2005).

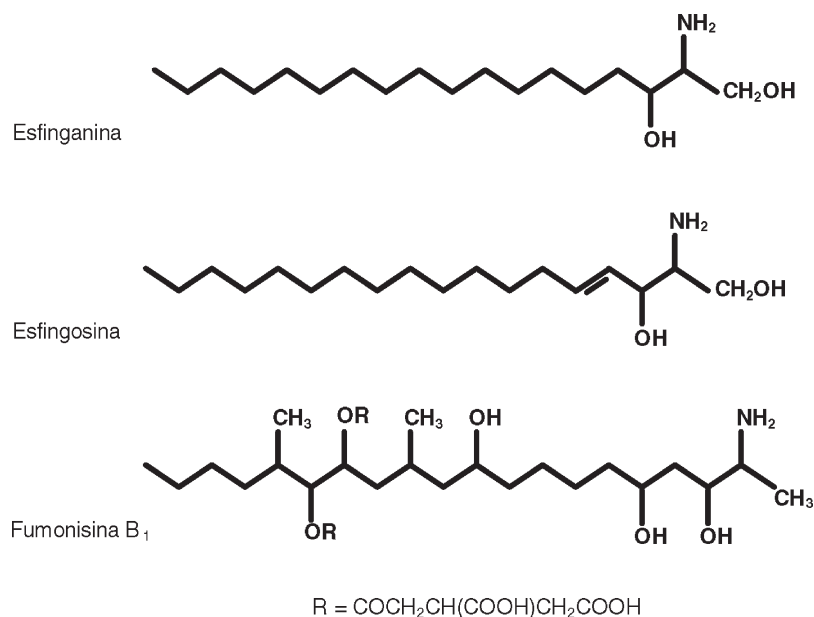


Figura II.2 Estrutura química da esfinganina, esfingosina e fumonisina B₁ (adaptado de Solfrizzo *et al.*, 1997).

Foi em 1991 que Wang *et al.* comprovaram que as FBs levam à desregulação do mecanismo dos esfingolípido, podendo, eventualmente, ter efeitos terapêuticos. A incubação de hepatócitos de ratos macho Sprague-Dawley com FB₁ 1 M, na altura considerada suspeita de provocar ELEM, PPE e cancro do fígado em ratos, levou à inibição da incorporação de serina-¹⁴C na fracção da So dos esfingolípido celulares. Por outro lado, a exposição à FB₁ conduziu ao aumento de Sa, por inibição da actividade da So N-aciltransferase, levando à desregulação da biossíntese *de novo* dos esfingolípido, tendo a sua acção sido rápida e persistente. Resultados semelhantes foram obtidos com a FB₂. Wang *et al.* (1991) defendem que, apesar de tóxicas, as FBs podem ser de utilidade terapêutica em doenças em que perturbações no *turnover* dos esfingolípido levam as células a acumular elevadas quantidades destas biomoléculas.

A determinação da razão Sa/So, em fluidos biológicos, permite assim avaliar a exposição à FB₁ (Riley *et al.*, 1994b; Solfrizzo *et al.*, 1997; Castegnaro *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 1999).

A sensibilidade deste biomarcador foi já demonstrada em diferentes espécies animais, tais como ratos, pôneis, suínos e primatas não humanos (Wang *et al.*, 1991; Riley *et al.*, 1994a; Yoo *et al.*, 1996; Castegnaro *et al.*, 1996; Shephard *et al.*, 1996b; Solfrizzo *et al.*, 1997; Castegnaro *et al.*, 1998; Westhuizen *et al.*, 1999; Abnet *et al.*, 2001; Qui e Liu, 2001; Seefelder *et al.*, 2002).

A disrupção da via metabólica dos esfingolípidos como resultado da inibição da enzima ceramida sintetase pelas FBs também resulta num aumento da degradação das bases esfingóides que são fosforiladas pela esfinganina cinase. O aumento no soro de Sa e So 1-fosfato foi observado em suínos e cavalos tratados com FBs. Outros estudos demonstraram o aumento destes metabolitos em tecidos renais e hepáticos e soro de ratos Sprague-Dawley tratados com FBs, levantando a possibilidade da Sa 1-fosfato poder ser um melhor biomarcador do que o rácio Sa/So, pelo menos em estudos realizados em animais (Shephard *et al.*, 2007). Os resultados encontrados por Cai *et al.* (2007) demonstraram que em ratos F344, os níveis urinários de SaP/SoP ou Sa/So são mais sensíveis do que os rácios determinados no soro, tanto para exposições agudas como sub-crónicas à FB₁. Quando comparado com o rácio Sa/So, o rácio SaP/SoP apresenta vantagens práticas, sendo considerado por alguns autores um biomarcador sensível e específico, especialmente em cenários de exposição sub-crónica como no caso dos humanos.

II.2.1. FLUIDOS BIOLÓGICOS

Riley *et al.* (1994b) reportaram, pela primeira vez, uma metodologia para a utilização da razão Sa/So como biomarcador da exposição às FBs em soro e urina de animais. Uma vez que os níveis de bases esfingóides livres ocorrem antes do aparecimento de outros marcadores bioquímicos induzidos por danos celulares causados pelas FBs, como por exemplo, a elevação dos níveis de enzimas hepáticas, esta razão foi proposta como um biomarcador específico no caso de consumo de dietas contaminadas com FBs.

Shephard *et al.*(1996b), estudaram, pela primeira vez, a inibição do metabolismo dos esfingolípidos em macacos vervet (*Cercopithecus aethiops*) alimentados durante 60 semanas com dietas contaminadas com quantidades reduzidas (0,3 mg kg⁻¹ peso corporal /dia) e elevadas (0,8 mg kg⁻¹ p.c./dia) de materiais de cultura de *F. moniliforme*. Verificaram que ocorreu um aumento da razão Sa/So no soro sanguíneo. Alterações similares foram observadas na urina (Tabela II.1).

Tabela II.1 Valores da razão Sa/So observados em estudos realizados em animais.

Animais	Quantidade de FBs adicionada à dieta	Razão Sa/So			Referência
		Soro	Urina	Tecidos (rim)	
Ratos BD IV					
(grupo controlo)	–	–	0,1 a 0,7	0,1	Castegnaro <i>et al.</i> ,1996
(grupo teste)	1-5 mg FB1 kg ⁻¹ p.c./dia		1,2 a 10	4 a 10	
Macacos vervet					
(grupo controlo)	–	0,43	0,87		Shephard <i>et al.</i> , 1996b
(grupo teste)	0,3 mg FB1 kg ⁻¹ p.c./dia	1,72	1,58	–	
	0,8 mg FB1 kg ⁻¹ p.c./dia	2,57	2,17		
Ratos BD IV					
(grupo controlo)	–	0,50 a 0,81			Castegnaro <i>et al.</i> , 1998
(grupo teste)	1 mg FB1 kg ⁻¹ p.c./dia	0,35 a 0,42	–	–	
Ratos BD IV					
(grupo controlo)		0,26 a 0,6			Castegnaro <i>et al.</i> , 1998
(grupo teste)	16,8 mg FB1 kg ⁻¹ p.c./dia	0,21 a 0,82			

De modo a confirmar os resultados obtidos, os autores monitorizaram os níveis de 5 enzimas funcionais hepáticas, tendo verificado um aumento dos mesmos nos grupos de animais expostos a dietas contaminadas, indicando assim que o fígado é um órgão alvo para as FBs. Neste estudo um grupo experimental

consumiu 0,3 mg de FBs kg^{-1} p.c./dia, durante o período de ensaio. Este nível de exposição pode ser relacionado com o estimado para diferentes populações humanas. A PDI de FBs para um habitante da região de Transkei, que consome milho não contaminado, é de 0,047 mg kg^{-1} p.c./dia. No entanto, a PDI de um habitante que consome milho contaminado aumenta para 0,355 mg kg^{-1} p.c./dia. Assim, a razão Sa/So pode ser usada em regiões cujas populações têm risco elevado por exposição às FBs. Já em áreas urbanas e em países desenvolvidos, onde o milho não é o constituinte principal da dieta mas é apenas um item da mesma, estando o consumo diário provável de FBs abaixo de 0,001 mg kg^{-1} p.c./dia, a razão Sa/So pode ser mascarada por variações naturais intra ou interindividuais (Shephard *et al.*, 1996b).

Estudos realizados em ratos Sprague-Dawley, por Riley *et al.* (1994a), indicam os rins como órgão alvo da toxicidade induzida por FBs, tendo sido sugerido que as alterações na razão Sa/So verificadas na urina possam constituir um biomarcador mais sensível do que as verificadas no soro. Wang *et al.* (1999) verificaram ainda que o consumo de FB_1 , por ratos macho Sprague-Dawley, pode levar, de acordo com a dose administrada, ao aumento irreversível de esfingosina e esfinganina na urina.

No entanto, nos estudos realizados por Shephard *et al.* (1996b) com macacos vervet, o rácio Sa/So no soro apresentou-se mais significativo como indicador do consumo de FBs.

O facto de os estudos realizados por Riley *et al.* (1994b), nos quais se determinou a razão Sa/So no soro, pulmões, fígado e rins após a exposição de animais a FBs, terem evidenciado que o rim é o órgão mais sensível e o facto de a elevação desta razão se verificar inicialmente na urina, levaram Solfrizzo *et al.* (1997) a desenvolver um método rápido para a determinação da razão Sa/So em urina de ratos macho Wistar e de humanos com o intuito de esta razão funcionar como biomarcador da exposição a FBs. Porém, no que diz respeito à urina humana, estes autores depararam-se com algumas dificuldades. Os valores de Sa e So eram mais elevados em urina de mulheres do que na dos homens, não sendo possível estabelecer um valor para a razão no caso da urina

masculina, uma vez que a Sa não pôde ser detectada abaixo de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ (LOD) em nenhuma das amostras analisadas (Tabela II.2). Todavia, caso se verifique uma exposição elevada a FBs existe acumulação de Sa, tornando-se o rácio um biomarcador eficiente.

Solfrizzo *et al.* (1997) referiram também que os níveis isolados de Sa e So em urina humana podem variar consideravelmente. Contudo, a razão Sa/So mantém-se, caso não haja exposição a FBs.

Castegnaro *et al.* (1998) reportaram um método para quantificar os níveis de Sa/So em soro humano e de ratos BDIV macho. Não se verificaram variações significativas nos valores de Sa/So em ratos adultos aos quais se administraram diariamente $1 \text{ mg FB}_1 \text{ kg}^{-1} \text{ p.c./dia}$ durante 5 semanas; mas verificou-se um aumento com significado estatístico marginal em ratos jovens aos quais administraram $16,8 \text{ mg FB}_1 \text{ kg}^{-1} \text{ p.c./dia}$, 3 vezes por semana, durante 63 semanas (Tabela II.1).

Relativamente à determinação da razão Sa/So em soro humano, Castegnaro *et al.* (1998) não verificaram diferença significativa entre os níveis de Sa/So observados em dadores saudáveis da África do Sul e em pacientes com EC. No entanto, factores diversos influenciaram este estudo, como seja o reduzido número de pacientes com EC, que eram exclusivamente do género masculino ao invés do grupo controlo, e o desconhecimento da duração da hospitalização antes da recolha das amostras.

Uma conclusão importante do estudo acima referido é a grande variação interindividual que se verifica na razão Sa/So quando compararam dadores saudáveis da África do Sul (com origem asiática) e de França (Tabela II.2). Factores genéticos e ambientais podem influenciar a razão Sa/So dum indivíduo.

Em 1999, Westhuizen *et al.* determinaram pela primeira vez a razão Sa/So em plasma e em urina de comunidades rurais consumidoras de milho da região de Transkei e da província de Kwazulu-Natal, na África do Sul, bem como do distrito de Bomet no Quénia. Nestas regiões foi correlacionada a contaminação do milho por FBs com a elevada incidência de EC. Estes autores determinaram

os níveis de Sa e So e da razão Sa/So em plasma e urina de indivíduos masculinos e femininos e também os níveis de FBs em amostras de milho colhidas, na mesma altura, nestas regiões. Os resultados obtidos encontram-se detalhados na Tabela II.2. Neste estudo os autores (Westhuizen *et al.*, 1999) não se depararam com o problema anteriormente descrito por Solfrizzo *et al.* (1997) no que diz respeito à baixa concentração de bases esfingóides em indivíduos do género masculino, tendo concluído que não existe uma diferença significativa entre indivíduos dos dois géneros para este parâmetro. De resto, os valores reportados por Westhuizen *et al.* (1999) estão de acordo com os reportados por Solfrizzo *et al.* (1997) e Castegnaro *et al.* (1998).

Os estudos realizados em variadas espécies animais às quais foram administradas FBs permitiram estabelecer a razão Sa/So como um possível biomarcador para a exposição a estas micotoxinas. Contudo, nestes estudos foram administradas doses elevadas de FBs com o objectivo de investigar as respostas patológicas das espécies animais à exposição às toxinas (Westhuizen *et al.*, 1999). De acordo com os níveis de contaminação do milho apresentados na Tabela II.2, a PDI em Transkei será mais elevada do que a encontrada no Quénia sendo esta comparável à de algumas populações da Europa ocidental. Em Kwazulu-Natal não se registou exposição. O valor médio da razão Sa/So no plasma e urina de indivíduos de Transkei não é significativamente diferente do observado nos grupos controlo, sendo possível que esta razão não seja suficientemente sensível para ser usada como biomarcador na exposição às FBs a estes níveis de PDI. Assim, esta razão pode apenas ser aplicada como biomarcador em estudos animais em que a exposição é relativamente elevada, havendo uma possível excepção caso uma dieta baseada em milho com bolor constituísse a dieta básica dos habitantes da região de Transkei. Outro problema na utilização deste biomarcador reside no facto de se verificar uma variação considerável entre indivíduos e no mesmo indivíduo ao longo do tempo (Westhuizen *et al.*, 1999).

Qui e Liu (2001) determinaram os níveis de Sa, So e Sa/So em urina de indivíduos adultos residentes na província chinesa de Henan e expostos a uma

dieta rica em milho, durante um mês. Os autores pretendiam desenvolver um método de LC suficientemente sensível para determinar a Sa livre em urina masculina, em consequência dos baixos níveis presentes, e monitorizar a razão Sa/So em indivíduos expostos a FB₁ presente em dietas ricas em milho. Tal como Solfrizzo *et al.* (1997) e Castegnaro *et al.* (1998), aqueles autores concluíram que a concentração de Sa e de So na urina feminina é mais elevada do que na masculina (Tabela II.2), apesar do método detectar as baixas concentrações presentes na urina masculina, em consequência da utilização de maiores volumes da matriz. Esta diferença entre os dois géneros permanece por explicar, podendo dever-se à contaminação por células epiteliais de zonas envolventes do aparelho urinário feminino. Também neste estudo se verificou que a razão Sa/So representa um melhor biomarcador do que as concentrações de Sa e de So isoladas uma vez que aquela se mantém constante.

Os níveis de FB₁ no milho foram também avaliados por Qiu e Liu (2001) (Tabela II.2), tendo também concluído não haver uma relação estatística significativa entre o consumo de FBs e a razão Sa/So na urina dos indivíduos, quer masculinos quer femininos. Estes resultados são concordantes com os apresentados pelos autores referidos anteriormente, podendo a razão Sa/So ser útil como biomarcador apenas quando as populações consomem dietas com altos teores de contaminação com FBs.

Em 2001, Abnet *et al.* estudaram a relação entre os níveis de esfingolípido decorrentes da exposição às FBs e o risco de EC na China. As concentrações de Sa e de So determinadas no soro sanguíneo revelaram não existir uma associação significativa entre estes compostos nem uma relação entre a razão Sa/So com a incidência de EC (Tabela II.2). Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Westhuizen *et al.* (1999).

Em 2004, Solfrizzo *et al.* compararam os níveis de esfingolípido na urina de populações humanas com elevado e reduzido consumo de milho, mais uma vez para avaliar a eficiência da razão Sa/So como biomarcador da exposição a FBs. Assim, as concentrações de Sa e de So foram quantificadas em urina de indivíduos residentes em duas regiões, uma no norte da Argentina e outra no sul

do Brasil, nas quais o consumo de milho é elevado e onde existe uma elevada incidência de EC e também na zona central da Argentina e no sul da Itália onde o consumo de milho é muito reduzido ou mesmo inexistente. Verificaram que o valor médio de Sa/So obtido nos dois grupos em que não se verificou consumo de milho eram similares, e semelhante ao descrito por Solfrizzo *et al.* (1997) e Qiu e Liu (2001). Porém, nos grupos com elevado consumo de milho a média da razão de Sa/So na urina foi significativamente mais elevada. Todavia, apesar dos níveis de FBs no milho no sul do Brasil e norte da Argentina serem semelhantes, os valores médios da razão Sa/So foram diferentes (Tabela II.2). Deste modo, os elevados valores de Sa/So encontrados no Brasil não podem ser associados só com a elevada exposição às FBs. Nos estudos levados a cabo com ratos (Solfrizzo *et al.*, 1997) e em que se comprovou que a razão Sa/So é um biomarcador útil, a PDI a que os animais foram expostos era 100 a 200 vezes mais elevada relativamente à PDI calculada para este estudo. Estes dados são similares aos estudos anteriormente descritos que defendem que a razão em questão é útil apenas quando a exposição é muito elevada.

Com o objectivo de estudar o papel das FBs ou de outras micotoxinas na etologia da nefropatia endémica (EN) – uma doença renal crónica presente em Brodska Posavina, Croácia – Ribar *et al.* (2001) determinaram a razão Sa/So em soro e em urina de indivíduos saudáveis e de indivíduos com EN da região endémica. Concluíram não existir diferenças estatisticamente significativas no valor da razão Sa/So no soro de indivíduos saudáveis e doentes da região endémica. Já na urina foram registadas alterações no valor da razão Sa/So em indivíduos do sexo masculino (Tabela II.2). Quer no soro quer na urina foram observadas variações nos níveis isolados de Sa e de So. O aumento dos níveis de Sa e de So e as alterações na razão Sa/So comprovaram a relação da EN com a alteração do metabolismo dos esfingolípido. Assim os autores, de acordo com os dados bibliográficos existentes, presumiram que os sujeitos estudados podem ter estado expostos às FBs, apesar de não possuírem informação sobre a contaminação alimentar por estas micotoxinas.

Tabela II.2 Valores da razão Sa/So observados em estudos realizados em humanos.

Região	Proporção Sa/So			Contaminação do milho (ng g ⁻¹)	Ingestão. (µg kg ⁻¹ p.c./dia)	Referência
	Soro	Plasma	Urina			
Transkei (África do Sul)	–	0,34±0,36 (n=154)	0,41±0,72 (n=153)	580 (n=40)	3,8	
Kwazulu-Natal (África do Sul)	–	0,44±0,23 (n=27)	–	n.d. (< 10)	–	Westhuizen <i>et al.</i> , 1999
Bomet (Quênia)		0,28±0,07 (n=29)	0,34±0,20 (n=27)	60 (apenas uma amostra; n=7)	0,06	
Sul de Itália	–	–	0,29 (n=6; sexo feminino)	–	–	Solfrizzo <i>et al.</i> , 1997
Lyon (França)						
(dadores saudáveis F)	0 a 0,78 (n=9)	–	–	–	–	
(dadores saudáveis M)	0,11 a 0,57 (n=8)					Castegnaro <i>et al.</i> , 1998
África do Sul						
(dadores saudáveis F)	0,09 a 0,44 (n=13)	–	–	–	–	
(dadores com EC, M)	0,16 a 0,36 (n=4)					
Linxian (China)						
(dadores saudáveis)	0,86±0,90 (n=185)	–	–	–	–	Abnet <i>et al.</i> , 2001
(dadores com EC)	0,79±0,75 (n=98)					
Henan (China)						
(dadores F)	–	–	0,20 (n=15)	80 a 41900	0,4 a 457 (F)	Qiu e Liu, 2001
(dadores M)			0,11 (n=13)		0,5 a 740 (M)	
Croácia						
(controlo F)	0,31±0,13 (n=20)		0,25±0,08 (n=20)			
(controlo M)	0,29±0,12 (n=20)	–	0,18±0,12 (n=20)	–	–	Ribar <i>et al.</i> , 2001
(dadores com nefropatia F)	0,67 (n=1)		0,14±0,08 (n=5)			
(dadores com nefropatia M)	0,10 (n=1)		1,60±1,59 (n=4)			
Sul Itália			0,36±0,02	–	sem consumo milho	Solfrizzo <i>et al.</i> , 2004
Centro Argentina			0,36±0,02	–	sem consumo milho	
Sul Brasil	–	–	1,57±0,49	350	0,57	
Norte Argentina			0,69±0,12	350	0,55	
Populações combinadas			1,27±0,332	–	0,56	

II.2.2. TECIDOS

Apesar de não ser tão vulgar a análise de esfinganina e de esfingosina em tecidos como é em urina, plasma e soro sanguíneo, alguns autores avaliaram a resposta de culturas celulares sujeitas à presença de FBs.

Delongchamp e Young, em 2001, desenvolveram modelos matemáticos que comprovam que os níveis de Sa em tecidos alvo (fígado e rins) constituem um biomarcador para a resposta à FB₁. Através do modelo empregue, os autores verificaram que a concentração de Sa no fígado de murganhos B6C3F1 e nos rins de ratos F344/N, sujeitos a uma dieta experimental, está relacionada com a incidência tumoral e a morte celular por apoptose. No entanto, os resultados parecem não ser tão fiáveis quando o modelo é aplicado a murganhos. Este facto pode dever-se ao facto de a FB₁ ser eliminada mais rapidamente em murganhos do que em ratos, pelo que para os mesmos nível e período de exposição o efeito será menor naquela espécie. Apesar de inicialmente os autores questionaram a utilidade dos níveis de esfinganina como biomarcador, uma vez que sofrem grandes variações, o modelo apresentado é suficientemente consistente para permitir o seu uso como biomarcador.

Em 2004, Sharma *et al.* concluíram que a actividade da esfingosina cinase confere resistência à apoptose celular induzida pela FB₁ em células renais embrionárias de origem humana. Apesar da FB₁ induzir citotoxicidade inibindo a ceramida sintetase, verificou-se que células renais embrionárias humanas são resistentes à toxicidade produzida por 25 µM de FB₁ durante 48 horas, não manifestando aumento de incidência de apoptose celular. O mesmo não se verificou em células do epitélio renal de suínos. No entanto, a manifestação do efeito tóxico da FB₁ nas células renais embrionárias humanas foi potenciado por um inibidor da esfingosina cinase.

Para além do bloqueio da biossíntese de esfingolípidos complexos, a FB₁ modula também a expressão de muitos factores de sinalização celulares (He *et al.*, 2005). He *et al.* (2005) concluíram que a miriocina, inibidor específico da serina palmitoil transferase, previne a acumulação de bases esfingóides no tecido

hepático de ratos expostos à FB_1 , sem, contudo, reduzir a hepatotoxicidade induzida pela toxina. Os autores concluíram ainda que a combinação de miriocina com FB_1 preveniu a elevação de esfinganina livre nos tecidos hepáticos e também a indução de genes sinalizadores selectivos. No entanto, a referida combinação não preveniu o aumento da concentração plasmática de alanina aminotransferase e apenas reduziu ligeiramente a concentração de aspartato aminotransferase. Também não se verificou qualquer alteração no que diz respeito à apoptose e proliferação celular induzidas pela FB_1 .

II.3. METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Shephard *et al.* (1992a) reportaram pela primeira vez um método para a determinação da FB_1 em fluidos biológicos, plasma e urina, de ratos macho BDIX. Até esta data a metodologia analítica usada na determinação da FB_1 restringia-se à sua quantificação em materiais de cultura, milho, rações e alimentos à base de milho.

II.3.1. EXTRACÇÃO

Em virtude de se tratar de moléculas fortemente polares, as FBs são solúveis em água e solventes polares e insolúveis em solventes orgânicos (Pozzi *et al.*, 2002). Na extracção, os solventes de eleição são o MeOH (Shephard *et al.*, 1992a; Sewram *et al.*, 2001; 2003; Meyer *et al.*, 2003) e o ACN (Shephard *et al.*, 1995a; Meyer *et al.*, 2003). Na remoção de lípidos recorre-se à utilização de hexano (Meyer *et al.*, 2003; Sewram *et al.*, 2003).

Chelule *et al.* (2000) determinaram a presença de FB_1 em fezes humanas, procedendo à extracção com EDTA, acidificação e centrifugação.

Os métodos analíticos previamente desenvolvidos para a determinação de FB_1 em amostras fisiológicas foram modificados por Shephard *et al.* (1995a) para

tornar possível a determinação de FB₂. Esse objectivo foi atingido pelo uso de solventes de extracção menos polares uma vez que esta micotoxina apresenta uma polaridade inferior à da FB₁.

Tal como a FB₁, a FB₂ é fortemente retida na matriz fecal e apenas por repetições sucessivas do processo extractivo é possível uma adequada recuperação analítica. O metanol simples não é indicado para ser utilizado como solvente de extracção na análise desta matriz, aumentando-se a eficiência extractiva com a utilização da mistura EDTA:MeOH (Shephard *et al.*, 1995a). Também a extracção de FBs a partir da matriz cabelo humano é complexa e morosa, para além de exigir pré-tratamento exaustivo da referida matriz (Sewram *et al.*, 2003).

II.3.2. PURIFICAÇÃO

A purificação é conseguida recorrendo à extracção em fase sólida (SPE) em fase reversa, usando sílica octadecilgada (C₁₈) (Shephard *et al.*, 1995a; Shephard e Snijman, 1999; Chelule *et al.*, 2000; Sewram *et al.*, 2001) ou troca aniónica (SAX) (Shephard *et al.*, 1992a; Shetty e Bhat, 1998; Shephard e Snijman, 1999; Sewram *et al.*, 2001; 2003; Meyer *et al.*, 2003) e ainda Amberlite XAD-2 (Shetty e Bhat, 1998).

Para determinar a presença de FB₁, Shephard *et al.* (1992a) efectuaram a purificação de urina e de plasma de ratos macho BDIX usando cartuchas SAX acondicionadas com MeOH e MeOH:H₂O, sendo a eluição efectuada com ácido acético em MeOH. Após evaporação o resíduo redissolve-se em MeOH. Segundo estes autores, a urina contém elevadas concentrações de interferentes, o que obsta a purificação com cartuchas SAX. Assim, para obter recuperações e reprodutibilidade aceitáveis, pequenos volumes de urina devem ser diluídos diversas vezes antes de se iniciar a fase de purificação. Shephard *et al.* (1995a) procederam de forma semelhante na determinação de FB₂ em amostras animais, no entanto, com excepção da urina, o resíduo foi redissolvido em borato de sódio.

Shetty e Bhat (1998) defendem que o método de Shephard *et al.* (1992a) não pode ser aplicado na análise de urina humana devido ao elevado número de interferentes, tendo usado um método mais sensível para determinar FB₁ neste fluido biológico. Para ultrapassar este inconveniente, o processo de purificação foi realizado em duas etapas, com resina Amberlite XAD-2 e com cartuchas SAX, o que permitiu a ausência de picos interferentes aquando da análise cromatográfica, sem comprometer a recuperação da FB₁. Estes autores defendem que, através da aplicação deste método, é possível detectar quantidades diminutas (LOD inferior a 8 ng mL⁻¹) de FBs em urina de indivíduos que consomem uma dieta contaminada.

As cartuchas SAX foram também escolhidas por Sewram *et al.* (2003) na análise de FBs em cabelo humano, por Meyer *et al.* (2003) na análise de tecidos de suínos, por Shephard e Snijman (1999) na purificação de extractos de plasma e urina e por Sewram *et al.* (2001) em extractos de amostras de pêlo de macacos vervet. Estes autores recorreram também à utilização de colunas C₁₈. Na purificação de extractos fecais, quer aquando da análise de FB₁ ou de FB₂, verifica-se a utilização de colunas C₁₈ (Shephard *et al.*, 1995a; Shephard e Snijman, 1999; Chelule *et al.*, 2000).

II.3.3. DERIVATIZAÇÃO

O reagente de derivatização eleito na análise de FB₁ e de FB₂ em amostras fisiológicas é o ortoftaldeído (OPA) (Shephard *et al.*, 1992; 1995a; 1995b; Shetty e Bhat, 1998; Shephard e Snijman, 1999; Chelule *et al.*, 2000). A reacção de derivatização dá-se entre o reagente derivatizante e a amina primária das FBs, na presença de 2-mercaptoetanol (MCE) (Figura II.3).

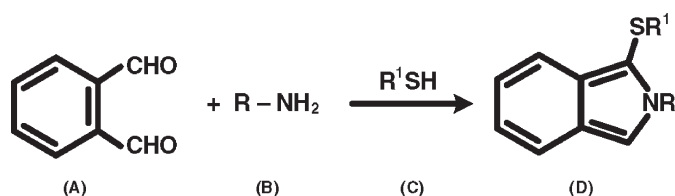


Figura II.3 Reacção de derivatização com OPA (A: OPA; B: FBs; C: MCE; D: derivado FBs-OPA).

Shephard *et al.* (1992a; 1995a) realizaram uma derivatização pré-coluna adicionando 200 μL de OPA a 50 μL de resíduo redissolvido. O derivado OPA apresentou-se estável durante 4 minutos. Este método já havia sido usado na determinação de FB_1 em alimentos compostos à base de milho. Assim, a utilização de OPA foi investigada com o objectivo de desenvolver uma metodologia analítica para quantificar FB_1 em amostras fisiológicas, tendo sido bem conseguida a separação do derivado OPA- FB_1 .

II.3.4. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

II.3.4.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Tal como na determinação de FBs em milho e em alimentos à base de milho, a cromatografia líquida (LC) é a técnica de separação mais usada na determinação destas micotoxinas em amostras biológicas.

As FBs, moléculas polares, são ideais para a detecção e a quantificação por LC em fase reversa. Shephard *et al.* (1992a) reportaram, pela primeira vez, metodologia analítica para a determinação de FB_1 em amostras biológicas de rato usando colunas de sílica octaligada (C_8). Outras colunas analíticas de fase reversa, como C_{18} têm sido usadas mais recentemente (Shephard *et al.*, 1995a; b; Shephard e Snijman, 1999; Chelule *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2003; Sewram *et al.*, 2003).

Na maioria dos casos é usada eluição isocrática, sendo a fase móvel mais recorrente a mistura $\text{MeOH}:\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (Shephard *et al.*, 1992a; 1995a; b; Shephard e Snijman, 1999; Chelule *et al.*, 2000). Sewram *et al.* (2003) e Meyer *et al.* (2003) usaram eluição em gradiente. Assim, os primeiros autores, fizeram variar ao longo do tempo da corrida a proporção de $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{ácido fórmico}$. Os segundos autores empregaram os mesmos solventes, mas isoladamente e em mistura: A– ACN; B– H_2O ; C– $\text{H}_2\text{O}:\text{ácido fórmico}$.

Tendo as FBs um comportamento iónico em solução, a separação em colunas de fase reversa baseia-se numa mistura de mecanismos de fase reversa e de troca iónica, como anteriormente se referiu. Observa-se uma grande variação de selectividade entre as diferentes colunas. Tal como na análise de alimentos, e aquando da utilização de colunas de fase reversa, para se conseguirem melhores resultados na separação cromatográfica, a fase móvel deve adicionada de ácido acético ou fórmico ou de um tampão que deve ser volátil para detecção por massa (MS) (Plattner, 1999).

A LC-FD, à semelhança do que sucede na análise de FBs em alimentos para consumo humano e animal, é também amplamente usada na análise das mesmas em amostras biológicas. A grande parte dos investigadores recorre ao detector de fluorescência, estabelecendo como comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) 335nm e como comprimento de onda de emissão (λ_{em}) 440nm, uma vez que o agente de derivatização escolhido por todos os autores é o OPA (Shephard *et al.*, 1992a; 1995a; b; Chelule *et al.*, 2000).

Na Tabela II.3 encontram-se sumariadas as condições cromatográficas utilizadas por diversos autores.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) permite a análise directa e a confirmação das FBs (Xie *et al.*, 1997). Sewram *et al.* (2003) e Meyer *et al.* (2003) usaram a interface *electrospray* na análise de FBs. Sewram *et al.* (2003) optimizaram os parâmetros MS separadamente para a FB₁, FB₂ e FB₃. Uma energia de colisão de 32 eV foi usada para fragmentar os iões moleculares protonados de cada fumonisina e os iões produto resultantes foram monitorizados e usados como indicadores da presença destas micotoxinas em cabelo humano. A aplicação de MS-MS permitiu incrementar a especificidade da detecção.

No estudo de Meyer *et al.* (2003) a FB₁ foi fragmentada e monitorizada, tendo a sua identificação e quantificação sido feita com base nos tempos de retenção e área dos picos dos iões seleccionados (m/z 722, 388, 300) por comparação com um padrão externo.

Tabela II.3 Condições cromatográficas por LC para a determinação de FBs em amostras biológicas.

Coluna analítica		Fase Móvel		Fluxo (mL.min ⁻¹)	λ (nm) OPA	Gama linearidade	Limite de detecção	Referência
Tipo	Comprimento (cm)	d.i. (mm)	Tamanho da partícula (µm)					
RP-C ₈	12,5	4,0	5	MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (66:34) ajustado a pH 3,4 com H ₃ PO ₄		1	exc:335 em:440	50 ng mL ⁻¹ Shephard <i>et al.</i> , 1992
RP-C ₁₈	5	4,0	3	MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (72:28) ajustado a pH 3,4 com H ₃ PO ₄		1	exc:335 em:440	Shephard e Suijman, 1999 Shephard <i>et al.</i> , 1995a; b
RP-C ₁₈	15	3,9		ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (50:50:1)		1	exc:335 em:440	Shetty e Bhat, 1998
RP-C ₁₈	15	3,9		MeOH:NaH ₂ PO ₄ 0,1M (80:20) ajustado a pH 3,4 com H ₃ PO ₄		1	exc:335 em:440	Chelule <i>et al.</i> , 2000
RP-C ₁₈	15	4,6	5	A-H ₂ O:ACN:Ác. Fórmico (90:10:0,1) B-H ₂ O:ACN:Ác. Fórmico (10:90:0,1)		0,7	LOQ=100 µg L ⁻¹ 25 pg	Sewram <i>et al.</i> , 2003
RP-C ₁₈	15	2,1	3,5	A-ACN B-H ₂ O C-H ₂ O:Ác. fórmico (95:5)		0,2	n.d. a 2 µg kg ⁻¹	Meyer <i>et al.</i> , 2003

– Informação não disponível
n.d. – não detectado

A aplicação de técnicas de espectrometria de massa permite a obtenção de limites de detecção (LODs) na ordem dos 25 pg em amostras de cabelo humano (Sewram *et al.*, 2003), 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em tecido muscular e adiposo de suínos e 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em tecido cardíaco de suínos (Meyer *et al.*, 2003). Os autores que aplicaram detecção por fluorescência na análise de FBs em amostras biológicas reportaram LODs na ordem dos 50 ng mL^{-1} para urina de ratos macho BDIX (Shephard *et al.*, 1992a), 8 ng mL^{-1} para urina humana (Shetty e Bhat, 1998) e 0,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para fezes humanas (Chelule *et al.*, 2000).

II.3.4.2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA

Chelule *et al.* (2000) também avaliaram a presença de FB_1 em fezes humanas por cromatografia em camada fina (TLC) em placa de sílica. A dissolução dos extractos secos foi efectuada com $\text{ACN:H}_2\text{O}$, o desenvolvimento com $\text{butanol:H}_2\text{O:CH}_3\text{COOH}$ e a revelação por pulverização com anisaldeído. A purificação insuficiente com C_{18} levou ao aparecimento de interferências. O facto de algumas amostras serem positivas quando analisadas com TLC e negativas quando analisadas com LC, pode dever-se ao facto de o anisaldeído não ser específico para as FBs.

Também Shephard *et al.* (1995a) usaram TLC para analisar a pureza radioquímica da $^{14}\text{C-FB}_2$ isolada a partir de culturas de *F. moniliforme* marcadas com carbono radioactivo.

II.3.4.3. MÉTODOS RADIOACTIVOS

Em 1996, Prelusky *et al.* aplicaram métodos radioactivos para o estudo da distribuição de resíduos de derivados- ^{14}C em amostras biológicas de suínos Yorkshire alimentados com FB_1 marcada. Para medir a radioactividade das amostras, estas foram analisadas através dum procedimento de combustão de oxigénio. As medições feitas por contagem de cintilação líquida (LSC) foram corrigidas para eficiência de combustão, diluição, extinção, fundo e eficiência de contagem. O limite de detecção em tecidos foi de aproximadamente de 46 ng g^{-1} .

II.3.4.4. MÉTODOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS – SISTEMA AVIDINA-BIOTINA- -PEROXIDASE

As características hidrofílicas das FBs conduzem à sua rápida excreção dos tecidos animais. Métodos mais sensíveis são necessários para a visualização directa de FBs *in situ*. Uma técnica capaz de identificar as FBs antes da sua excreção seria útil para a sua detecção em tecidos e poderia explicar a origem de algumas lesões. Alguns métodos imuno-histoquímicos têm sido avaliados. A técnica da avidina-biotina-peroxidase consiste numa combinação de técnicas anatómicas, imunológicas e histoquímicas que permite a localização de antígenos específicos em estruturas de tecidos definidas. Uma reacção específica entre a FB₁-anticorpo monoclonal e o sistema avidina-biotina-peroxidase foi desenvolvida para demonstrar a presença de FBs em células hepáticas e renais de aves, tendo permitido melhorar o diagnóstico patológico de lesões agudas e sub-agudas (Buim *et al.*, 1999). Através da utilização de anticorpos monoclonais anti-FB₁ e do sistema avidina-biotina-peroxidase, o fígado e rim de frangos Leghorn brancos, aos quais foi administrada FB₁ e FB₂, foram analisados por Buim *et al.* (1999) com o objectivo de detectar e conhecer a distribuição de FBs. Desta reacção resulta um complexo electronodenso que pode ser analisado ao microscópio óptico ou electrónico.

II.4. METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO ESFINGANINA/ESFINGOSINA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A medição directa de FBs em amostras biológicas não é um bom indicador da exposição, nomeadamente humana, às FBs uma vez que estas micotoxinas são eliminadas pouco tempo após a ingestão (Ribar *et al.*, 2001). A estrutura química das FBs assemelha-se largamente com a da esfingosina e a da esfinganina (Figura II.2), inibindo a enzima ceramida sintetase, uma enzima chave no metabolismo dos esfingolípidos e levando à acumulação de esfinganina e à redução dos níveis de esfingolípidos complexos (Riley *et al.*, 1994a; b).

II.4.1. EXTRACÇÃO

Riley *et al.* (1994a) reportaram, pela primeira vez, metodologia analítica complexa e morosa (Solfrizzo *et al.*, 1997) para a determinação do rácio Sa/So a partir de soro, urina e tecidos animais diversos. Após extracção com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$, incubação a 37°C , adição de CHCl_3 e H_2O alcalinizada e centrifugação, a fase orgânica, após secagem e evaporação, é submetida a um processo de hidrólise alcalina, com o objectivo de clivar os acilglicerolípidos e hidrolisar os liso esfingolípídios – bases esfingóides modificadas no grupo hidroxilo do C_1 – libertando, assim, a So e a Sa. A detecção de Sa livre é complexa já que a eficiência extractiva por vezes é baixa, podendo esta limitação ser problemática quando o seu conteúdo é da ordem de pmol g^{-1} , observando-se também variações intra e interindividuais na quantificação da Sa e da So. Nesta situação a utilização do padrão interno Sa C:20 simplifica a quantificação. O seu uso é no entanto desnecessário quando, para se detectar a inibição da Sa N-aciltransferase induzida pelas FBs, se utiliza a elevação do rácio Sa/So e não as bases esfingóides isoladamente (Riley *et al.*, 1994a; Shephard *et al.*, 1996b; Solfrizzo *et al.*, 1997; Qiu e Liu, 2001).

A metodologia extractiva de Riley *et al.* (1994a) foi seguida por outros autores (Shephard *et al.*, 1996b; Wang *et al.*, 1999; Ribar *et al.*, 2001; Abnet *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 2003), embora, nalguns casos, com algumas modificações, nomeadamente no que diz respeito à adição de NH_4OH à amostra (Solfrizzo *et al.*, 1997; Ribar *et al.*, 2001).

Numa tentativa de melhoramento do processo anterior, alguns autores optaram ainda pelo recurso à hidrólise ácida com a finalidade de libertar as bases esfingóides a partir dos esfingolípídios complexos, determinando a concentração total das bases esfingóides (Yoo *et al.*, 1996).

Na determinação de Sa e So em soro de ratos BDIV e de humanos alguns autores optam pelo acetato de etilo (Castegnaro *et al.*, 1998; Garren *et al.*, 2001) que permitiu reduzir o tempo dispendido no processo extractivo e obtenção de recuperações mais elevadas. Não obstante, a sensibilidade deste

método na análise de soro humano não é completamente satisfatória (Castegnaro *et al.*, 1998).

Shephard e Westhuizen (1998) adaptaram o método que Solfrizzo *et al.* (1997) usaram para a determinação do rácio Sa/So na urina, para procederem à análise no soro, defendendo que a determinação de bases esfingóides nesta matriz permite ultrapassar o obstáculo levantado pelos baixos níveis de Sa presentes na urina de indivíduos do género masculino. Após desproteínização do soro com MeOH, centrifugação, mistura com H₂O e NH₄OH, a extracção foi efectuada com CHCl₃. Esta metodologia foi seguida na análise do rácio Sa/So em plasma e urina de populações rurais da África do Sul expostas a FBs (Westhuizen *et al.*, 1999).

Para obviar o problema das baixas concentrações de Sa livre na urina nos indivíduos do género masculino (Solfrizzo *et al.*, 1997; Castegnaro *et al.*, 1998), o que inevitavelmente origina baixas sensibilidades, pode recorrer-se ao aumento do volume da amostra. Assim, Qui e Liu (2001) e Garren *et al.* (2001) extraíram 2 mL de urina de indivíduos do género feminino e 40 a 60 mL de urina de indivíduos do género masculino.

II.4.2. PURIFICAÇÃO

A grande maioria dos autores não recorre à purificação dos extractos (Wang *et al.*, 1991; Riley *et al.*, 1994b; Shephard *et al.*, 1996b; Yoo *et al.*, 1996; Castegnaro *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Qui e Liu, 2001; Ribar *et al.*, 2001; Abnet *et al.*, 2001; Garren *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2002). Porém outros optam por SPE com uma minicoluna de sílica gel (Solfrizzo *et al.*, 1997; 2004), que permite reduzir o tempo de análise comparativamente aos que recorrem à hidrólise alcalina. A eluição das bases esfingóides é efectuada com CHCl₃:MeOH:NH₄OH e o resíduo redissolvido em MeOH:H₂O.

Embora para a generalidade das matrizes tal purificação seja adequada, para o soro humano verificou-se a necessidade de proceder a uma hidrólise alcalina dos eluídos para eliminação de interferências que ainda permaneciam no eluído. Esta metodologia foi aplicada a plasma e urina de humanos por Westhuizen *et al.* (1999).

II.4.3. DERIVATIZAÇÃO

Na análise de Sa e de So em amostras biológicas, o agente de derivatização mais usado é, à semelhança do que sucede com as FBs, o ortoftaldeído (OPA) na presença de MCE (Wang *et al.*, 1991; Riley *et al.*, 1994b; Shephard *et al.*, 1996b; Yoo *et al.*, 1996; Solfrizzo *et al.*, 1997; 2004; Castegnaro *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Qiu e Liu, 2001; Ribar *et al.*, 2001; Abnet *et al.*, 2001; Garren *et al.*, 2001).

Os volumes de OPA empregues são diversos, bem como os tempos de repouso após a adição do agente derivatizante.

Tal como a extracção, o processo de derivatização referenciado por alguns autores (Riley *et al.*, 1994b; Shephard *et al.*, 1996b; Ribar *et al.*, 2001) é também complexo, uma vez que, após adição de OPA, envolve a centrifugação.

Yoo *et al.* (1996) desenvolveram um processo de derivatização ligeiramente mais simplificado, ressuspendendo o resíduo de bases esfingóides livres em tampão da fase móvel seguido de adição de OPA. Para determinação das bases esfingóides totais, o resíduo é redissolvido em etanol seguido de diluição em tampão da fase móvel e adição de OPA.

Solfrizzo *et al.* (1997) recorreram a um processo de derivatização com OPA mais simples. O método de extracção e de derivatização proposto por estes autores demora, na sua totalidade, 2 horas por oposição ao método de Riley *et al.* (1994b) que necessita de 9 horas para a sua execução.

A derivatização com OPA é usada rotineiramente na medição dos níveis de bases esfingóides, uma vez que o facto de apresentar boa resolução no modo de fase reversa permite uma quantificação reprodutível. A reacção ocorre com o grupo amina primário das bases esfingóides, formando-se um fluoróforo isoindole, na presença de MCE. Contudo, por vezes, os derivados OPA são instáveis à temperatura ambiente, podendo esta instabilidade ser parcialmente explicada pela desintegração das estruturas isoindole e, por outro lado, pela oxidação experimentada ao longo do tempo pelo MCE. Deste modo, metodologia mais sensível e estável é fundamental na análise de pequenas

quantidades de amostra ou amostras com conteúdo reduzido de bases esfingóides (Cho *et al.*, 2002). Com o objectivo de aumentar a referida estabilidade, alguns autores optam pela refrigeração, o que permite que os derivados permaneçam estáveis durante 24 horas (Yoo *et al.*, 1996; Shephard e Westhuizen, 1998).

Cho *et al.* (2002) obviaram este problema usando NDA. O princípio desta derivatização é a reacção do NDA, a 60°C, na presença do ião cianeto, com o grupo amina das bases esfingóides, formando-se um derivado 1-ciano-2-alkil-benzoisindole (CBI), uma estrutura altamente fluorescente (Figura II.4). Comparando a estabilidade de ambos os derivados, OPA e NDA, durante 24 horas, verificaram que a fluorescência dos derivados OPA diminui 36,8%, enquanto que a dos derivados NDA diminui apenas 13,4% (Cho *et al.*, 2002). Situação análoga foi verificada aquando da análise de amostras de milho e seus derivados (Lino *et al.*, 2006). A intensidade da fluorescência, apresentada pelo NDA é também superior (Cho *et al.*, 2002).

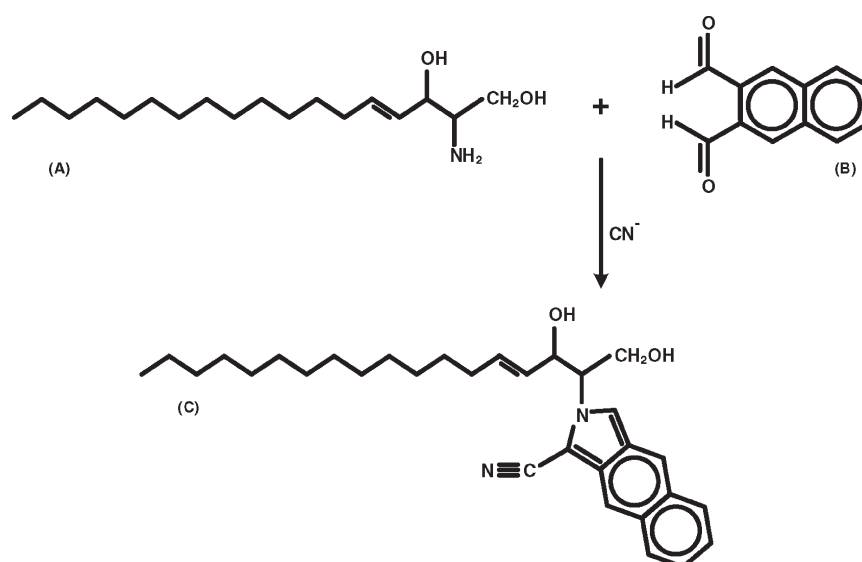


Figura II.4 Reacção de derivatização da So com NDA
(A: So; B: NDA; C: derivado So-NDA).

II.4.4. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

II.4.4.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida (LC) é a técnica analítica de separação mais usada na determinação de Sa e de So em amostras biológicas.

Em 1991, Wang *et al.* ao estudarem, pela primeira vez, o mecanismo pelo qual as FBs inibem a biossíntese *de novo* dos esfingolípidos, usaram LC na análise da massa das bases de cadeia longa.

A LC-FD tem sido usada por inúmeros investigadores para determinar a quantidade relativa de So e Sa livres no soro, urina e tecidos variados (Wang *et al.*, 1991; Riley *et al.*, 1994b; Shephard *et al.*, 1996b; Yoo *et al.*, 1996; Solfrizzo *et al.*, 1997; 2004; Castegnaro *et al.*, 1998; Westhuizen *et al.*, 1999; Qiu e Liu, 2001; Ribar *et al.*, 2001; Garren *et al.*, 2001).

No que concerne às colunas analíticas, todos os procedimentos, conhecidos, para LC utilizam colunas de fase reversa C₁₈ para separar as bases esfingóides, já que estas permitem uma eficiência elevada na análise dos derivados OPA, permitindo também uma pressão reduzida e boa estabilidade (Solfrizzo *et al.*, 1997). Em relação à escolha das dimensões da coluna observa-se alguma disparidade (Tabela II.4).

Dois tipos de eluição são usados, isocrática (Riley *et al.*, 1994b; Shephard *et al.*, 1996b; Yoo *et al.*, 1996; Shephard e Westhuizen, 1998; Wang *et al.*, 1999; Westhuizen *et al.*, 1999; Ribar *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2002) e gradiente (Solfrizzo *et al.*, 1997; 2004; Castegnaro *et al.*, 1998; Qiu e Liu, 2001; Abnet *et al.*, 2001; Garren *et al.*, 2001). Em ambas as eluições o solvente mais utilizado é o MeOH, verificando-se, no entanto, variações nas misturas utilizadas (Tabela II.4). Outros autores recorrem ao ACN (Cho *et al.*, 2002). Solfrizzo *et al.* (1997) não registaram diferenças nos cromatogramas usando uma fase móvel em cuja composição entrava ou não tampão fosfato de potássio. Consideram que este tampão, usado por Riley *et al.* (1994b), entre outros autores, não é necessário já que os derivados OPA-Sa e OPA-So não possuem grupos ionizáveis, ao contrário do que sucede com as FBs.

Tabela II.4 Condições cromatográficas por LC para a determinação de bases esfinzóides em amostras biológicas.

Coluna analítica		Fase móvel		Fluxo		λ (nm)		Gama linearidade	Limite de detecção	Referência
Comprimento d. i. (cm)	Tamanho particular (µm)	Eluição isocrática	Eluição gradiente	(mLmin ⁻¹)		OPA	NDA			
RP-C ₁₈	10	8	4	MeOH (89-90%): tampão fosfato potássio 0,005 M (10-11%), pH 7,0		2	Exe: 335-340 Em: 440-255	-	-	Riley <i>et al.</i> , 1994b Yoo <i>et al.</i> , 1996
RP-C ₁₈	10	8	4	MeOH: tampão fosfato potássio (0,005 M) (93:7) pH 7,0		2	Exe: 335-340 Em: 440-255	-	-	Shepherd <i>et al.</i> , 1996b
RP-C ₁₈	15	4,6	5	A - MeOH:H ₂ O (9:1), 13 min B - MeOH, 5min		1	Exe: 335 Em: 440	-	-	Sofrizzo <i>et al.</i> , 1997; 2004
RP-C ₁₈	25	4,6	5	A - K ₂ HPO ₄ (0,07M):MeOH (1:9) B - MeOH		1	Exe: 340 Em: 355	-	-	Castegnaro <i>et al.</i> , 1998
RP-C ₁₈	15	4,6	5	MeOH:H ₂ O (90:10)		1,5	Exe: 340 Em: 355	-	0,02 (rácio)	Shepherd e Westhuizen, 1998
RP-C ₁₈	15	4,6	5	MeOH:H ₂ O (91:9)		1	Exe: 340 Em: 355	-	-	Westhuizen <i>et al.</i> , 1999
RP-C ₁₈				MeOH:tampão fosfato potássio (5 mM) (91:9), pH 7,4				-	-	Wang <i>et al.</i> , 1999
RP-C ₁₈				MeOH:H ₂ O (91:9)		2		-	-	Ribar <i>et al.</i> , 2001 Tran <i>et al.</i> , 2003
RP-C ₁₈	15	3,9	4	A - 0,07 M K ₂ HPO ₄ :MeOH (1:9) B - MeOH		1	Exe: 335 Em: 440	0,1 a 0,3 ng	♀: 0,15 ng mL ⁻¹ ♂: 0,005 ng mL ⁻¹	Qui e Liu, 2001
RP-C ₁₈	15	4,6		ACN:H ₂ O (87%) ACN:H ₂ O (90%)		1	Exe: 340 Em: 455	Exc: 252 Em: 483	10 a 50 pmol	Cho <i>et al.</i> , 2002
RP-C ₁₈	25	4,6	5	A - K ₂ HPO ₄ (0,07 M): MeOH (1:9) B - MeOH		1	Exe: 335 Em: 440	-	-	Garren <i>et al.</i> , 2001

- Informação não disponível

A lavagem da coluna com ACN (Shephard *et al.*, 1996b) ou MeOH (Solfrizzo *et al.*, 1997) entre cada injeção é importante para impedir a eluição de picos interferentes.

Os fluxos adoptados variam, porém, 1 mL min⁻¹, é o mais utilizado. O mesmo acontece com os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e de emissão (λ_{em}) que variam de acordo com o reagente de derivatização empregue (Tabela II.4).

Diversos métodos de LC-FD estão disponíveis para a análise de Sa e de So. No entanto, as interferências provenientes dos diferentes componentes das amostras dificultam uma quantificação precisa e exacta das bases esfingóides. Adicionalmente, estes procedimentos são morosos e complexos, requerendo a execução de inúmeros passos (Seefelder *et al.*, 2002).

A espectrometria de massa (LC-MS) é uma ferramenta eficiente permitindo elevadas selectividade e sensibilidade (Skoog *et al.*, 1998), tendo também bastante aplicabilidade na análise de FBs (Plattner, 1999; Musser e Plattner, 1997; Cirillo *et al.*, 2003a; Royer *et al.*, 2004).

Seefelder *et al.* (2002) desenvolveram metodologia analítica rápida e precisa para a determinação de Sa e de So em culturas celulares do epitélio renal humano usando cromatografia líquida com ionização por *electrospray* e detecção por massa (LC-ESI-MS). A separação cromatográfica foi realizada numa coluna analítica de fase reversa C₁₈ usando gradiente binário de ácido trifluoroacético (TFA) em H₂O e de TFA em MeOH (fluxo de 200 μ L min⁻¹). A ionização por *electrospray* foi efectuada com uma voltagem de 3,5 kV e a 200°C, tendo o N₂ sido usado como *sheath* e como gás auxiliar. O detector de massa no modo *selected ion monitoring* (SIM) detectou iões positivos [M+H]⁺ de So (m/z 300), Sa (m/z 302) e PSO (m/z 318). A aplicação deste método permitiu um LOD de 10 pg para a So e de 25 pg para a Sa.

II.4.4.2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA E MÉTODOS RADIOACTIVOS

A cromatografia em camada fina (TLC) e métodos radioactivos têm sido usados. Através destas técnicas foi possível verificar que a disrupção do metabolismo dos esfingolípido seria um evento crítico em doenças associadas ao

consumo de FBs (Wang *et al.*, 1991). Na análise de lípidos, as células expostas a FBs durante 0 a 4 dias foram depois colocadas num meio com [¹⁴C] serina na presença ou ausência de FBs. Após incubação de 2 a 16 horas, as células foram retiradas do meio e os lípidos extraídos e sujeitos a uma hidrólise ácida. A Sa e a So resultantes foram então separadas por TLC em placas de sílica gel, desenvolvidas com CHCl₃:MeOH:NH₄OH, e o perfil radioactivo determinado por *scanning* radiométrico e contagem de cintilação, sendo as bases esfingóides visualizadas com ninhidrina.

Na medição da actividade relativa da So N-aciltransferase em hepatócitos intactos, as células foram incubadas com FB₁ e depois com [3H]-So. Os lípidos foram então extraídos e as [3H]-ceramidas da [3H]-So foram separadas usando TLC com placas de sílica desenvolvidas em éter dietílico:MeOH e visualizadas com vapor de iodo e a quantidade de material marcado determinada por contagem de cintilação (Wang *et al.*, 1991).

Os resultados obtidos por Yoo *et al.* (1996) foram confirmados por TLC. Assim, os lípidos obtidos na hidrólise ácida e não derivatizados foram separados em placas de sílica gel desenvolvidas com CHCl₃:MeOH:NH₄OH e as bases Sa e So visualizadas recorrendo a vaporização com ninhidrina.

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO III – DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS B₁ E B₂ EM MILHO E ALIMENTOS À BASE DE MILHO DESTINADOS AO CONSUMO HUMANO

- III.1. Introdução
- III.2. Amostragem
- III.3. Materiais e métodos
 - III.3.1. Reagentes químicos e soluções padrão
 - III.3.2. Materiais e equipamento
 - III.3.3. Ensaio de fortificação
 - III.3.4. Extração e purificação
 - III.3.4.1. Método A
 - III.3.4.2. Método B
 - III.3.5. Derivatização
 - III.3.6. Cromatografia líquida com detecção por fluorescência
 - III.3.7. Cromatografia líquida com ionização por *electrospray* e detecção por massa
 - III.3.8. Cromatografia líquida com ionização por *electrospray* e detecção por massa-massa
- III.4. Resultados e discussão
 - III.4.1. Otimização da metodologia analítica
 - III.4.1.1. Extração e purificação
 - III.4.1.2. Cromatografia líquida com detecção por fluorescência
 - III.4.1.3. Cromatografia líquida com detecção por massa
 - III.4.1.4. Cromatografia líquida com detecção por massa-massa
 - III.4.1.5. Comparação entre LC-FD, LC-MS e LC-MS-MS
 - III.4.2. Ocorrência de FBS nas amostras analisadas
 - III.4.2.1. Milho e alimentos derivados
 - III.4.2.2. Broa
 - III.4.2.3. Ingestão diária estimada
- III.5. Conclusões

III.1. INTRODUÇÃO

A distribuição geográfica generalizada do fungo produtor de fumonisinas (FBs) no milho, o *F. verticillioides (moniliforme)*, e a sua natureza endófito no mesmo resultaram na ocorrência natural de FBs no milho e em produtos derivados deste a nível mundial (Bolger *et al.*, 2001). Em diversos países incluindo Marrocos (Zinedine *et al.* 2006), Brasil (Bittencourt *et al.*, 2005), Nigéria (Bankole e Mabekoje, 2004) e África do Sul (Sydenham *et al.*, 1990; Waalwijk *et al.*, 2008) foram encontrados elevados níveis de contaminação por FBs em milho. Na Europa, estudos esporádicos foram recentemente publicados (Scudamore e Patel, 2000; Cirillo *et al.* 2003a; Molinié *et al.* 2005; Ariño *et al.*, 2007b).

O milho (*Zea mays* L.) constitui uma das mais importantes colheitas para Portugal, representando, em 2003, uma área cultivada de 126.000 ha e uma produção de 665.000 Mt (FAO, 2003). No entanto, em Portugal, uma única investigação relativa à pesquisa de FB₁ e FB₂ em nove amostras de milho híbrido naturalmente contaminado, resultantes da colheita de 1992 da Escola Agrícola de Coimbra, está referenciada internacionalmente, revelando uma elevada frequência de contaminação, 100% (Doko *et al.*, 1995). Desde então nenhum outro estudo foi realizado, apesar do elevado consumo de milho, bem como de alimentos derivados do mesmo.

Em particular, no que respeita à broa, um pão tradicional à base de milho, muito consumido, especialmente nas zonas Norte e Centro de Portugal, não existem dados relativos à sua contaminação por FBs. Contrariamente, existem diversos estudos no que respeita à presença de FBs em alimentos tradicionais de outros países como *tortilla* e *polenta*. Estes são produtos típicos derivados de milho do México e norte de Itália, respectivamente, apesar de serem também consumidos noutros países (Usleber *et al.*, 1994; Doko e Visconti, 1994; Patel

et al., 1997; Piñeiro *et al.*, 1997; Stack, 1998; Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999; Dombrink-Kurtzman *et al.*, 2000; Palencia *et al.*, 2003; De La Campa *et al.*, 2004).

Sendo produtos tradicionais de diferentes países produzidos, principalmente, a partir de milho, os processos de cocção da *tortilla*, *polenta* e broa são muito diferentes. A preparação da *tortilla* envolve um tratamento alcalino usando Ca(OH)_2 (Shephard *et al.*, 1996a; Stack, 1998; Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999). A *polenta* envolve a fervura de milho amarelo moído (www.initaly.com).

A produção tradicional de broa consiste em adicionar farinha de milho peneirada, farinha de trigo, água quente, fermento e massa fermentada da última broa. Após misturar, trabalhar, e deixar repousar, a massa é cozida num forno a lenha (www.gastronomias.com). Este procedimento está esquematizado na Figura III.1.

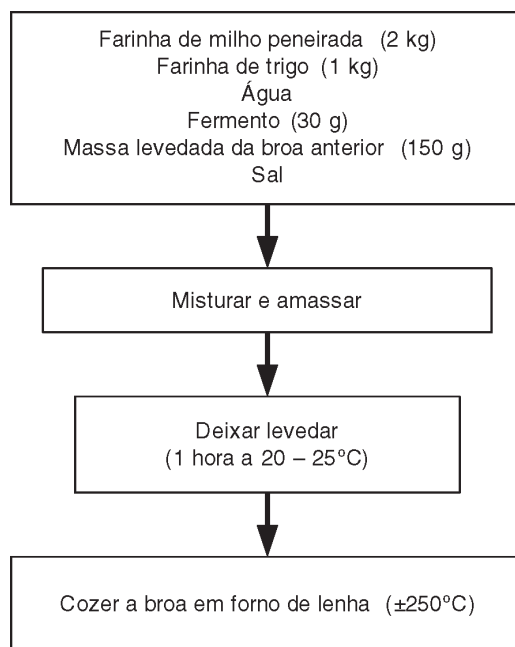


Figura III.1 Esquematização da produção tradicional de broa.

Uma vez que a exposição às FBs se constata a nível mundial, verifica-se a necessidade da obtenção de dados confiáveis relativos à exposição dietética das populações a estas micotoxinas (Shephard *et al.*, 1996a). Desde a sua descoberta e caracterização em 1988, verificou-se um progresso significativo no desenvolvimento das metodologias analíticas usadas para a sua detecção (Duncan *et al.*, 1998), que foram anteriormente revistas no Sub-capítulo I.2.

Resumidamente, a maioria dos métodos publicados baseiam-se numa extracção com mistura de solventes polares (Cortez-Rocha *et al.* 2003; Lombaert *et al.* 2003), purificação através de processos de extracção em fase sólida (SPE), sobretudo com colunas de imunoafinidade (IAC) (Cortez-Rocha *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003) que apresentam maior especificidade, ou outros adsorventes (Castro *et al.*, 2004; Bittencourt *et al.*, 2005), e derivatização, geralmente usando orto-ftalaldeído (OPA) na presença de 2-mercaptoetanol (MCE) (Bankole e Mabekoje, 2004; Bittencourt *et al.*, 2005), ou naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (NDA) na presença do ião cianeto (Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999; Lombaert *et al.*, 2003). A detecção e quantificação são sobretudo conseguidas por cromatografia líquida (LC) com detecção espectrofluorimétrica (FD) (Castro *et al.*, 2004; Bittencourt *et al.*, 2005).

Metodologias analíticas de LC com detecção por massa (MS) foram também aplicadas com sucesso na quantificação de FB₁ e também FB₂ em milho e alimentos derivados, recorrendo à técnica de API com ESI e APCI (Cirillo *et al.*, 2003a; Zollner e Mayer-Helm, 2006). A técnica de espectrometria de massa em *tandem* (MS-MS) permite maior certeza, sensibilidade e selectividade na quantificação do analito em estudo (Paepens *et al.*, 2005; Faberi *et al.*, 2005).

Um dos objectivos deste estudo consistiu na optimização de um método sensível e preciso para a determinação de FBs em milho e derivados, através da utilização de LC com derivatização pré-coluna e detecção por fluorescência. Foram também optimizadas metodologias analíticas de LC com detecção por massa, usando um quadrupolo simples (LC-MS) e um quadrupolo triplo – QqQ (LC-MS-MS).

Estes métodos revelaram-se úteis para a avaliação da exposição dietética dos consumidores portugueses da zona Centro de Portugal e também dos consumidores espanhóis da Comunidade Valenciana. Assim, foram providenciados dados sobre a ocorrência natural de FB_1 e de FB_2 em milho e produtos derivados para consumo humano, nomeadamente broa, da zona Centro de Portugal, usando LC-FD, com derivatização pré-coluna e confirmação por LC-ESI-MS. Foram também analisados produtos derivados de milho, incluindo alimentos orgânicos e não orgânicos, adquiridos comercialmente em Valência, Espanha, usando LC-ESI-MS e LC-ESI-MS-MS.

III.2. AMOSTRAGEM

Um total de 67 amostras de milho e alimentos derivados foi comercialmente adquirido no período de Março a Julho de 2005 a partir de lojas, lojas homeopáticas e supermercados localizados na cidade de Coimbra, Portugal. Foram adquiridas as seguintes matrizes: milho amarelo (n=9), milho branco (n=2), farinha de milho (n=3), sémola de milho (n=3), amido de milho (n=3), milho doce (n=11), cornflakes (n=16), cereais mistos (n=4) e snacks de milho (n=16) (Figura III.2). Sempre que necessário, as amostras foram finamente moídas recorrendo a um triturador.

Foram também comercialmente adquiridas 30 amostras de broa (Figura III.2) durante Setembro de 2005 em padarias, pastelarias e supermercados localizados na cidade de Coimbra e localidades limítrofes – zona Centro de Portugal.

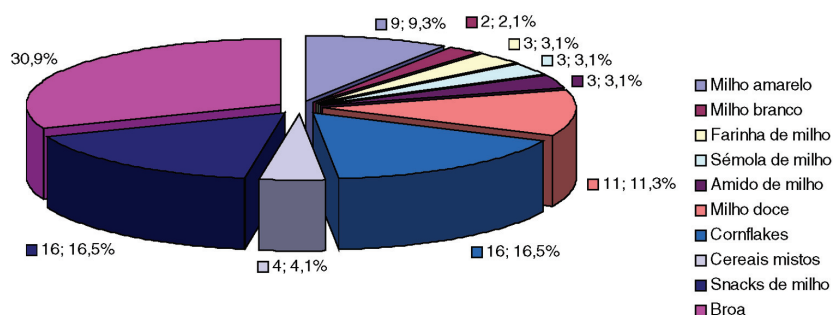


Figura III.2 Amostragem de milho, alimentos derivados e broa comercialmente adquirida em Coimbra, Portugal, durante 2005.

Um total de 41 amostras (Figura III.3) de alimentos derivados de milho foi adquirido comercialmente em lojas, lojas homeopáticas e supermercados localizados na cidade de Valência – Espanha, durante o período de Janeiro a Março de 2006. Quinze amostras tinham origem orgânica.

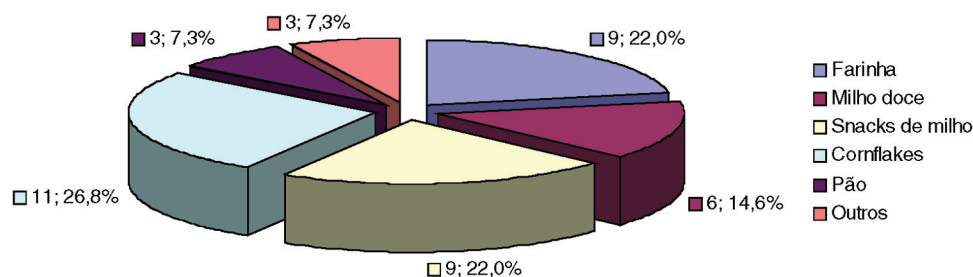


Figura III.3 Amostragem de alimentos derivados de milho comercialmente adquirida em Valência, Espanha, durante 2006.

Todas as amostras foram analisadas no mais curto espaço de tempo possível após a sua aquisição.

III.3. MATERIAIS E MÉTODOS

III.3.1. REAGENTES QUÍMICOS E SOLUÇÕES PADRÃO

Os padrões de FB₁ e FB₂, o NDA e o MCE foram comercialmente obtidos na Sigma Chemicals Co (St. Louis, EUA). O OPA foi obtido da Carlo Erba (Milão, Itália).

Acetonitrilo e metanol de grau HPLC foram adquiridos na Carlo Erba (Milão, Itália). Ácido acético, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, cloreto de potássio, hidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato di-sódio anidro, cianeto de potássio, tetraborato de sódio e cloreto de sódio foram obtidos na Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido fórmico foi obtido na Scharlau Chemie (Barcelona, Espanha). A água usada foi bidestilada. Foram usados solventes de grau para HPLC e reagentes de grau analítico para todos os fins.

A solução de tampão fosfato salino (PBS) foi preparada dissolvendo 0,2 g de cloreto de potássio, 0,2 g de hidrogenofosfato de potássio, 1,2 g de hidrogenofosfato di-sódio anidro e 8,0 g de cloreto de sódio em 990 mL de água destilada, ajustando em seguida o pH a 7,0 com HCl a 25% e, por fim, perfazendo o volume a 1 L.

O reagente de derivatização OPA foi preparado misturando 40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio aquoso 0,1 M e 50 μ L de 2-mercaptoetanol. A solução de NDA foi preparada a 0,5 mg mL⁻¹ em acetonitrilo. A solução de cianeto de potássio foi preparada a 0,13 mg mL⁻¹. Uma solução de tetraborato de sódio 0,05 M foi ajustada a pH 9,5 com NaOH 1 N.

As soluções stock foram preparadas nos viais dos padrões adquiridos na Sigma Chemicals adicionando-lhes 1 mL de acetonitrilo:água (50:50), uma vez que as FBs são mais estáveis em acetonitrilo do que em metanol para um armazenamento de longa duração (Velásquez et al., 2000; Cavaliere *et al.*, 2005), obtendo-se uma concentração final de 1000 μ g mL⁻¹. Soluções intermédias foram preparadas a 50 μ g mL⁻¹, diluindo 250 μ L da solução stock com 5 mL de acetonitrilo:água (50:50). Soluções padrão trabalho foram, de igual modo, preparadas em acetonitrilo:água (50:50) com concentrações oscilando entre 25 e 0,1 μ g mL⁻¹ para ambas as FBs.

Para a curva de calibração para LC-FD foram usadas as seguintes concentrações: 5,0; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,25 μ g mL⁻¹. Para a curva de calibração para LC-MS e LC-MS-MS as concentrações usadas foram: 25; 10; 2,5; 1,0; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025 μ g mL⁻¹.

Para a realização de ensaios de fortificação usando LC-FD, LC-MS e LC-MS-MS, em milho e derivados e em broa foram preparadas soluções trabalho com acetonitrilo: água (50:50) a 5 e 10 μ g mL⁻¹ para ambas as FBs.

Todas as soluções foram mantidas a 4°C em recipientes âmbar para estarem protegidas da luz e congeladas quando não em utilização.

III.3.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTO

No trabalho experimental foi usado o seguinte material e equipamento em qualquer dos métodos cromatográficos:

- colunas de imunoafinidade FumoniTest™ (IAC) adquiridas na Vicam (Watertown, USA);
- sistema Milli Q (Millipore, Bedford, MA, EUA);
- filtro Whatman N.º 1;
- filtro de microfibras Whatman 934-AH, 110 mm;
- sistema de vácuo;
- centrifugadora Meditronic S-599 (Selecta, Barcelona, Spain);
- misturador vortex Retsh (Haan, Alemanha);
- banho térmico;
- filtro de membrana 0,45 µm tamanho de poro
- banho de ultrassons Sonorex RK 100 (Berlim, Alemanha).

O equipamento de cromatografia com detecção por fluorescência (LC-FD) consistiu em:

- bomba Gilson modelo 307 (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France);
- injetor Rheodyne 7125 (Cotati, CA, USA);
- pré-coluna C₁₈ – 5 µm Nucleosil 120 KS (30 mm x 4 mm d.i.);
- coluna analítica C₁₈ – 5 µm Nucleosil 120 (250 mm x 4,6 mm d.i.);
- espectrofluorímetro Perkin Elmer LS45 (Perkin Elmer, Beaconsfield, UK);
- integrador 3390 (Hewlett Packard Philadelphia, PA).

O equipamento de cromatografia com detecção por massa (LC-ESI-MS) Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) HP-1100 Series consistiu em:

- bomba de solvente binária;
- auto-injetor;

- pré-coluna LiChrosorb RP-8 (4 cm x 2 mm d.i.) da Phenomenex (Madrid, Spain);
- coluna analítica Luna C₁₈ – 5 µm (150 mm x 4,6 mm d.i.) da Phenomenex (Madrid, Spain);
- detector de massa acoplado a estação analítica de trabalho. Este detector consistiu numa fonte API *Standard* que pode ser configurada como APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*) ou ESI (*electrospray ionization*).

O equipamento de cromatografia com detecção por massa-massa (LC-ESI-MS-MS) Waters 2695 (Milford, MA, USA) consistiu em:

- bomba de 4 canais;
- auto-injector;
- coluna analítica C₁₈ X Bridge™ 3,5 µm (100 x 2,1 mm d.i.) (Waters, Ireland);
- detector de massa TQ Quattro LC da Micromass (Manchester, U.K.) equipado com uma interface *electrospray* assistida pneumaticamente e uma interface Z-spray;
- software Mass Lynx NT 4.1 para processamento de dados.

III.3.3. ENSAIOS DE FORTIFICAÇÃO

As recuperações de FBs a partir de milho, amido de milho e broa foram determinadas fortificando a amostra moída de cada matriz, efectuando 3 replicados, com quantidades conhecidas de FBs. Para LC-FD, as concentrações finais de FBs variaram entre 100 µg kg⁻¹ e 250 µg kg⁻¹ para as matrizes milho e amido de milho e foram de 250 µg kg⁻¹ para a FB₁ e 200 µg kg⁻¹ para a FB₂ para a matriz broa. Para LC-MS e LC-MS-MS os níveis de fortificação foram de 400 e 200 µg kg⁻¹ para ambas as FBs.

III.3.4. EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO

III.3.4.1. MÉTODO A

As amostras moídas (50 g), adicionadas de 5 g de NaCl foram colocadas num copo misturador. Após adição de 100 mL de metanol:água (80:20 v/v), procedeu-se à mistura a velocidade máxima durante 5 min e filtração com papel de filtro. Uma alíquota de 10 mL de extracto filtrado foram transferidos para outro recipiente e diluídos com 40 mL de PBS. Esta mistura foi então filtrada com um filtro de microfibras e 10 mL foram purificados através de uma IAC acoplada ao sistema de vácuo. A coluna foi lavada com 10 mL de PBS e as FBs eluídas com 1,5 mL de metanol. Após evaporação suave com azoto a 60 °C, o resíduo foi redissolvido com 50 µL de metanol: água (50:50 v/v).

III.3.4.2. MÉTODO B

As amostras moídas (25 g) foram extraídas com 40 mL da mistura extractiva metanol:água (80:20 v/v) e centrifugadas durante 15 min a 2500 g. O resíduo sólido foi re-extraído com 30 mL da mistura anteriormente mencionada por mais duas vezes. Os três extractos foram combinados e filtrados. Previamente ao procedimento de purificação, 10 mL de filtrado diluídos com 40 mL de PBS foram filtrados com um filtro microfibras. De seguida adicionaram-se 20 mL à IAC acoplada ao sistema de vácuo. A coluna foi lavada com 10 mL de PBS e as FBs eluídas com 2 x 1,5 mL de metanol. Após evaporação suave com azoto a 60°C, o resíduo foi reconstituído com 50 µL de metanol: água (50:50 v/v).

III.3.5. DERIVATIZAÇÃO

Para a análise por LC-FD, o resíduo foi reconstituído em 50 µL de metanol:água (50:50, v/v), agitando no vortex, e a determinação e quantificação

efectuadas com base nos derivados NDA das FBs, de acordo com Chu e Li (1994) e Bennett e Richard (1994), com algumas modificações. Assim, 500 µL de tampão tetraborato de sódio 0,05M, 500 µL de cianeto de potássio e 150 µL de reagente NDA foram adicionados ao resíduo reconstituído. A mistura foi aquecida durante 15 min a 60°C e arrefecida à temperatura ambiente.

III.3.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA

Os derivados NDA-FBs foram injectados no cromatógrafo que consistiu no equipamento descrito no Sub-capítulo III.3.2. A fase móvel, acetonitrilo:água:ácido acético (61:38:1, v/v/v), após filtração e desgasificação, foi mantida a um fluxo de 1 mL min⁻¹. A determinação foi realizada a um comprimento de onda de excitação de 420 nm e um comprimento de onda de emissão de 500 nm. O volume de injeção foi de 25 µL.

A análise isocrática efectuada de acordo com as condições descritas permitiu a eluição da FB₁ e da FB₂ com um tempo de retenção de cerca de 7,36 min e 13,35 min, respectivamente (Figura III.5).

III.3.7. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY* E DETECÇÃO POR MASSA

Para a análise e confirmação da presença de FBs por LC-ESI-MS, o resíduo foi reconstituído em 500 µL metanol:água (50:50, v/v).

Os solventes examinados para fase móvel foram o metanol e água adicionados de ácido acético ou fórmico, usando eluição isocrática ou em gradiente. Após optimização, a separação analítica foi realizada usando o seguinte gradiente: A – 35% água:ácido fórmico 0,5% e B – 65% metanol: ácido fórmico 0,5%, isocrática durante 4 min, aumentando depois para 95% B e 5% A em 4 min, mantendo durante 7 min. O fluxo usado foi de 0,5 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 10 µL.

O sistema ESI-MS foi operado no modo de íão positivo com as seguintes condições: temperatura de gás 350°C, fluxo do gás dessecante 13,0 L min⁻¹, pressão do nebulizador 30 psi e voltagem de capilar 4000 V. O espectro de massa foi obtido por *scanning* desde *m/z* 300 a 800.

Os íões positivos mais abundantes da FB₁ (íão positivo *m/z* = 722) e da FB₂ (íão positivo *m/z* = 706) foram monitorizados por *selected ion monitoring* (SIM), usando parâmetros de alta resolução e um *dwell time* de 400 ms. As voltagens de cone aplicadas variaram entre 60 e 180 V. A resposta mais elevada foi obtida a 140V para ambos os compostos, assim, este foi o valor escolhido para identificação e quantificação. As condições acima descritas permitiram a eluição da FB₁ e da FB₂ com tempos de retenção de 6,87 min e 12,22 min, respectivamente (Figura III.6).

III.3.8. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY E DETECÇÃO POR MASSA-MASSA

Tal como para LC-MS, a análise por LC-MS-MS foi efectuada após reconstituição do resíduo em 500 µL metanol:água (50:50, v/v). A separação analítica, realizada a 30°C, foi efectuada usando uma eluição em gradiente com água e metanol como fase móvel A e B, respectivamente, ambas contendo ácido fórmico a 0,5%. Após 3 min de eluição isocrática com 65% B, aumentou-se linearmente para 75% B em 4 min mantendo-se constante durante 3 min. Finalmente, as condições iniciais foram mantidas durante 10 min. O fluxo adoptado foi de 0,3 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 10 µL.

A análise foi efectuada no modo de íão positivo. Os parâmetros usados na fonte ESI foram os seguintes: voltagem do capilar 3,20 kV; temperatura da fonte de extracção 125°C; temperatura de dessolvatação 300°C; fluxo do gás de dessolvatação (azoto, 99,99% pureza) 500 L/h. As condições ideais de fragmentação foram conseguidas variando a voltagem do cone e a energia de colisão para cada composto. A voltagem de cone escolhida foi 50 V. A energia de colisão usada foi de 40 eV para a FB₁ e 35 eV para a FB₂.

Para a detecção de FB_1 o ião precursor foi m/z 722, sendo os iões produto seleccionados m/z 352 e 334. Para a FB_2 , o ião precursor foi m/z 706, e os iões produto m/z 318 e 336.

As condições acima descritas permitiram a eluição da FB_1 e FB_2 com um tempo de retenção de cerca de 2 min e 5 min, respectivamente (Figura III.9).

III.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.4.1. OPTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

III.4.1.1. EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO

Com o método A, usando quer filtração normal (Lombaert *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003) quer filtração sob vácuo, as recuperações foram cerca de 50%. Deste modo, verificou-se a necessidade de modificar o processo de filtração, uma vez que a “papa” produzida após a extracção conduziu à obstrução do papel de filtro Whatman N.º 1, sem ou com a aplicação de vácuo, levando a perdas. Para obviar este problema, resultante das características da amostra, foi essencial a utilização dum processo eficiente que permitisse a separação do resíduo da matriz do solvente de extracção.

Assim, para melhorar a eficiência deste passo, a centrifugação foi crucial (Solfrizzo *et al.*, 2001). Por outro lado, o tempo dispendido aquando da aplicação do método B foi muito inferior. A centrifugação permitiu uma boa separação entre o resíduo da amostra e o solvente de extracção quando uma força de 2500 g foi aplicada, contrariamente ao que se observou com a aplicação de 500 g e 1000 g. Com o objectivo de otimizar a metodologia analítica foram realizados diferentes ensaios. A extracção de 25 g de uma amostra contaminada, fortificada com $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 e de FB_2 , e centrifugação repetida por duas vezes, usando 50 mL de solvente de extracção, resultou em recuperações de 61,5% para a FB_1 e 95,6% para a FB_2 . Como o resultado obtido para a FB_1 não foi satisfatório, a centrifugação foi realizada por 3 vezes e a eluição das FBs a partir da IAC repetida por duas vezes com 1,5 mL de metanol.

A mistura metanol:água (80:20 v/v), usada anteriormente por Cortez-Rocha *et al.* (2003), foi usada com sucesso como solvente na extração de FBs a partir de milho e produtos derivados do mesmo.

III.4.1.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA

Optimização das condições para a derivatização

Os padrões de FB₁ e de FB₂ foram inicialmente analisados usando derivatização pré-coluna com orto-ftaldeído (OPA) e separação por LC em fase reversa com eluição isocrática, seguida de detecção por fluorescência. Para que a eluição das FBs da coluna analítica de fase reversa produza picos simétricos e bem resolvidos é necessário acidificar a fase móvel (Plattner, 1999). Diferentes condições cromatográficas foram experimentadas (Tabela III.1).

Tabela III.1 Comparação de diferentes condições cromatográficas aquando da utilização do OPA (λ_{exc} =335 nm e λ_{em} =440 nm).

Volume de OPA (μ L)	Quantidade de padrão (ng)	Fase Móvel	Fluxo (mL min^{-1})
100	1000	A – ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (49,5:49,5:1,0)	1,0
100	50	B – ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (59,0:40,0:1,0)	1,0

Quando a fase móvel A foi usada, de acordo com Bittencourt *et al.* (2005), obtiveram-se tempos de retenção longos, 12,57 min para a FB₁ e 33,10 min para a FB₂. Assim, com o objectivo de os reduzir, aumentou-se a proporção de acetonitrilo observando-se a diminuição dos tempos de retenção para 5,49 e 10,09 para a FB₁ e FB₂, respectivamente.

Vários derivados fluorescentes estão referenciados. Apesar da mistura derivatizante OPA-MCE ser correntemente a mais usada, apresenta a desvantagem de exibir uma degradação dependente do tempo, conduzindo a uma diminuição rápida da fluorescência logo após a derivatização (Bennett e Richard, 1994; Shephard, 1998; Williams *et al.*, 2004). Esta desvantagem foi ultrapassada pelo uso do NDA que está referenciado em diversos estudos (Chu e Li,

1994; Bennett e Richard, 1994; Scott e Lawrence, 1995; Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999; Lombaert *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004).

A reacção de derivatização com NDA foi realizada de acordo com Chu e Li (1994) e Bennett e Richard (1994), com algumas modificações. Os melhores resultados foram obtidos usando 150 µL de reagente de derivatização e redissolvendo-se o resíduo em 50 µL de metanol:água (50:50). Diferentes fases móveis foram também avaliadas de acordo com a Tabela III.2. Os melhores resultados foram obtidos com ACN:H₂O:CH₃COOH (61:38:1, v/v/v).

Tabela III.2 Comparação de diferentes condições cromatográficas com NDA ($\lambda_{exc}=420$ nm e $\lambda_{em}=500$ nm).

Fase Móvel	Fluxo (mL min ⁻¹)
A – 65% ACN:CH ₃ COOH (99:1) + 35% H ₂ O: CH ₃ COOH (99:1)	1,0
B – ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (63:36:1)	1,0
C – ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (60:39:1)	1,0
D – ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (59:40:1)	0,9
E – ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (62:40:1)	1,0
F – ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (61:38:1)	1,0

O NDA com o KCN formou um derivado altamente fluorescente e relativamente estável durante mais de 24 h, tal como defendido por Shephard (1998).

Os estudos de estabilidade dos derivados fluorescentes do NDA foram realizados repetindo a injeção do mesmo padrão, após 24 horas (2 ensaios) e após oito dias (1 ensaio) (Tabela III.3). Este estudo demonstrou que após um dia a diminuição da estabilidade dos derivados NDA-FB₁ e NDA-FB₂ foi pouco significativa. No entanto, foi também observada um pequeno aumento na percentagem do derivado NDA-FB₁, tal como foi referenciado por Bennett e Richard (1994). Após oito dias a perda de FB₂ foi mais significativa do que a de FB₁. Os derivados NDA-FBs apresentam maior estabilidade do que os derivados OPA-FBs, tal como referenciado por Sydenham *et al.* (1992a) e Williams *et al.* (2004). O NDA também tende a produzir maior sensibilidade quando níveis de toxinas mais baixos estão presentes nas amostras (Chu e Li, 1994).

Tabela III.3 Estabilidade dos derivados fluorescentes do NDA expressa em ng e em percentagem, ng (%).

FBs	1 dia	1 dia	8 dias
FB ₁ ng (%)	1,04 (100) → 1,15 (110)	2,08 (100) → 1,65 (79,4)	2,08 (100) → 1,41 (67,7)
FB ₂ ng (%)	1,04 (100) → 0,66 (62,9)	2,08 (100) → 1,56 (75,0)	2,08 (100) → 0,67 (32,1)

Linearidade

As curvas de calibração (Figura III.4) foram obtidas usando um procedimento de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados da área do pico *versus* a concentração. A linearidade para a FB₁ e FB₂, nas soluções padrão trabalho, para quatro determinações de cinco níveis de concentração diferentes, entre 0,25 e 5,0 µg mL⁻¹, o que corresponde a 0,52 ng e 10,4 ng injectados, foi adequada, o que se comprova pelos coeficientes de correlação (r^2) obtidos, 0,984 e 0,994 para a FB₁ e para a FB₂, respectivamente.

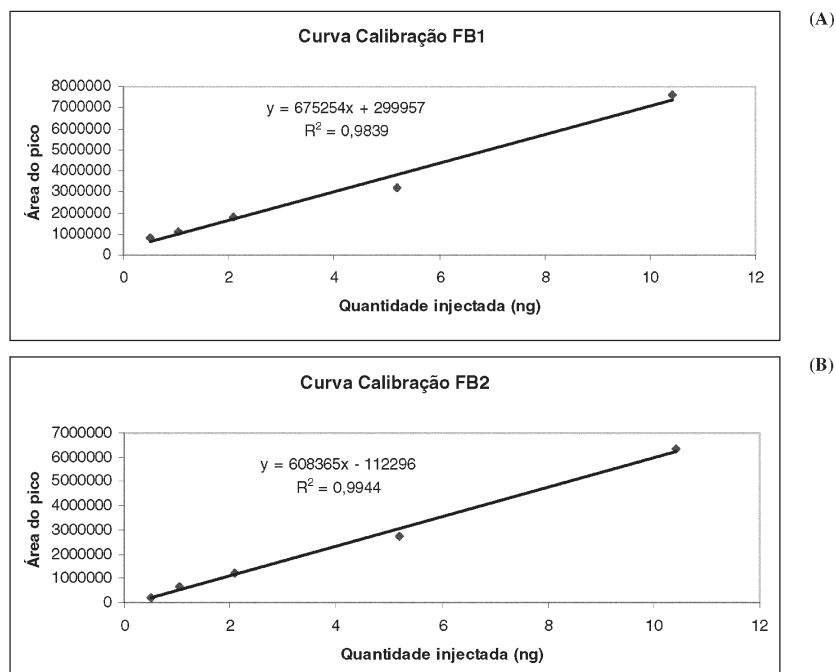


Figura III.4 Linearidade da FB₁ (A) e FB₂ (B) obtida por LC-FD avaliada entre 0,52 ng e 10,4 ng injectados.

Na Figura III.5 apresentam-se cromatogramas de LC-FD de um padrão, de uma amostra fortificada com $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_2 , e de uma amostra contaminada analisadas pelo método B.

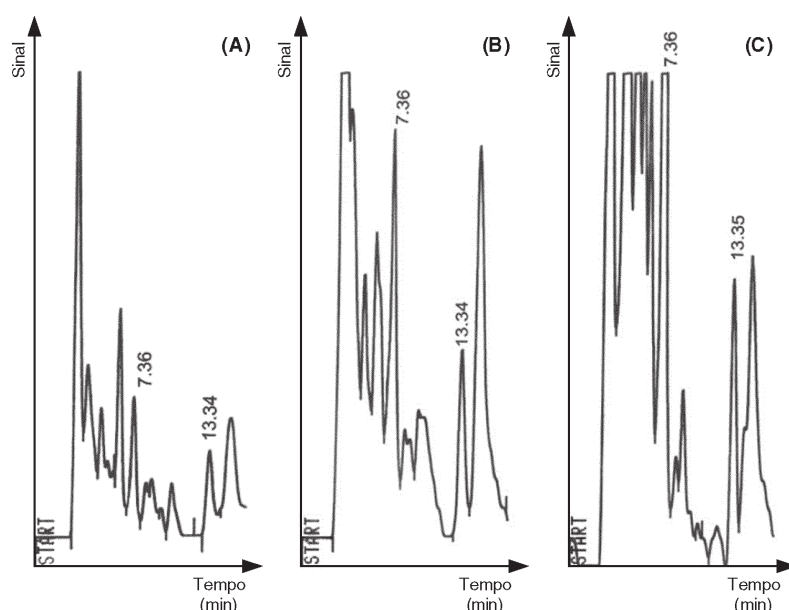


Figura III.5 Cromatogramas de LC-FD de A: um padrão $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fumonisina B_1 e B_2 (tempo de retenção 7,36 e 13,34 min para a FB_1 e FB_2 , respectivamente); B: uma amostra fortificada com $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_2 ; C: uma amostra contaminada com $441 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 e $237 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_2 , obtidos usando a metodologia otimizada.

Exactidão e precisão da metodologia analítica

Os resultados referentes aos estudos de exactidão e precisão para a matriz amido de milho encontram-se explicitados na Tabela III.4.

Os valores de recuperação para a FB_1 , usando o método B, foram 79,0% e 98,5% para níveis de fortificação de 150 e $250 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Para a FB_2 foram 98,4% e 99,6% para níveis de fortificação de 100 e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

A precisão foi calculada através da repetibilidade intra-dia ($n=3$) e repetibilidade inter-dia (3 dias). Para a FB_1 , a repetibilidade intra-dia obtida

oscilou entre 3,0 e 3,9% para níveis de fortificação de 150 e 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Para a FB₂ foi 2,7 e 10,4% a 200 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. A repetibilidade inter-dia (3 dias; n=9) obtida para a FB₁ oscilou entre 10,0 e 14,0% para níveis de fortificação de 150 e 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Para a FB₂ estes valores foram 15,1 e 15,8% a 200 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Tanto os valores obtidos para a exactidão como os RSD estão de acordo com características de performance da FB₁ e da FB₂ estabelecidos pela EC 2005/38/EC de 6 Junho 2005 e pela EC N.º 401/2006 de 23 de Fevereiro de 2006, e cujas directivas Portugal adoptou em Diário da República, Decreto-Lei n.º 50/2006 de 2 de Março.

Tabela III.4 Exactidão e resultados de validação intra-dia (n=3) e inter-dia (n=9) obtidos com o método optimizado para LC-FD para a matriz amido de milho.

FBs	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação média (%)	RSD intra-dia (%)	RSD inter-dia (%)
FB ₁	150	79,0	3,0	10,0
	250	98,5	3,9	14,0
FB ₂	100	98,4	10,4	15,8
	200	99,6	2,7	15,1

O limite de detecção (LOD) usando o procedimento de derivatização com NDA, para um sinal-ruído de 3:1, foi 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₁ e 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₂.

Para a matriz broa, a exactidão foi, de igual modo, determinada através do cálculo dos valores de recuperação médios para cada nível de fortificação (Tabela III.5). A recuperação obtida para a FB₁ foi de 99,7% para um nível de fortificação de 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e para a FB₂ foi de 74,8% para um nível de fortificação de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A precisão foi calculada através da repetibilidade intra-dia (n=3) e da repetibilidade inter-dia (3 dias). Para a FB₁, a repetibilidade intra-dia obtida foi de 6,5% para um nível de fortificação de 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e para a FB₂ foi de 8,6% para 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A repetibilidade inter-dia (n=9) obtida para a FB₁ foi 7,5% e para a FB₂ 15,2% para um nível de fortificação de 250 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$,

respectivamente. Os valores de exactidão e precisão estão também de acordo com as características de performance para a FB₁ e FB₂ estabelecidas pelas directivas europeias anteriormente mencionadas e adoptadas por Portugal.

Tabela III.5 Exactidão e resultados de validação intra-dia (n=3) e inter-dia (n=9) obtidos com o método optimizado para LC-FD para a matriz broa.

FBs	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média de recuperação (%)	RSD intra-dia (%)	RSD inter-dia (%)
FB ₁	250	99,7	6,5	7,5
FB ₂	200	74,8	8,6	15,2

III.4.1.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECÇÃO POR MASSA

Como pode ser observado na Figura III.5, a presença de interferentes perto do tempo de retenção da FB₁ aquando da determinação por LC-FD pode, eventualmente, perturbar a análise. Por isso, as amostras analisadas por LC-FD foram confirmadas por LC-MS.

Em LC-MS, a abundância e sensibilidade de ambas as FBs foi reduzida quando se utilizou acetonitrilo como fase móvel. Assim, o metanol foi seleccionado como solvente de eluição para a fase móvel.

Para a determinação de FBs por LC-MS, foi considerado o tipo de fonte, o modo de ionização e as condições do detector. Preliminarmente, foram realizadas análises de fluxo contínuo (FIA) com o objectivo de avaliar as interfaces *electrospray ionization* (ESI) e *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI). A ESI permitiu maior sensibilidade, podendo as amostras ser directamente ionizadas em fase líquida a temperatura *quasi*-ambiente, minimizando assim a degradação de compostos termolábeis. A ESI é uma técnica ideal para detectar e quantificar FBs, uma vez que estas apresentam um comportamento iónico e produzem um sinal abundante. No modo de ião positivo (PI) a molécula protonada da FB₁ apresenta uma relação massa/carga (m/z) de 722 e a da FB₂ apresenta uma m/z 706. No modo de ião negativo (NI) o ião M-H para a FB₁ é m/z 720 e para a FB₂ m/z 704. Uma sensibilidade de detecção cinco vezes

superior foi obtida aquando da utilização do modo de ião positivo, comparativamente ao modo de ião negativo.

A formação de aductos de Na⁺ foi observada no modo de ião positivo (Tabela III.6). A adição de ácido fórmico a 0,5% à fase móvel tornou a mistura de solventes usada suficientemente acídica para eliminar os aductos de sódio.

Após experimentação de diferentes gradientes, os melhores cromatogramas foram obtidos usando A – 35% água: ácido fórmico 0,5% e B – 65% metanol: ácido fórmico 0,5%, isocrática durante 4 min, aumentando para 95% B e 5% A em 4 min e mantendo as últimas condições durante 7 min, um gradiente baseado no usado por Faberi *et al.* (2005). Na Tabela III.6 apresentam-se os iões de FB₁ e FB₂ adquiridos nos modos de ionização positiva e negativa.

Tabela III.6 Comparação dos modos de ião positivo (PI) e negativo (NI) na interface ESI em quadrupolo simples.

	<i>Mw</i>	ESI (<i>m/z</i> e iões adquiridos)	
		Modo positivo	Modo negativo
FB ₁ (C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅)	721,83	722 [M+H] ⁺ 744[M+Na] ⁺	720 [M-H] ⁻
FB ₂ (C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄)	705,80	706 [M+H] ⁺ 728 [M+Na] ⁺	704 [M-H] ⁻

A melhor voltagem de fragmentação para ambos os compostos foi de 140V. A Figura III.6 mostra um cromatograma e um espectro obtido por *selected ion monitoring* (SIM) de uma solução padrão e de uma amostra contaminada.

Foram determinados diferentes parâmetros de validação. A LC-ESI-MS permitiu uma resposta linear no intervalo entre 0,1 µg mL⁻¹ e 25 µg mL⁻¹, o que corresponde 1 e 250 ng injectados, com bons coeficientes de correlação (*r*²), 0,9995 para a FB₁ e 0,9997 para a FB₂ (Figura III.7).

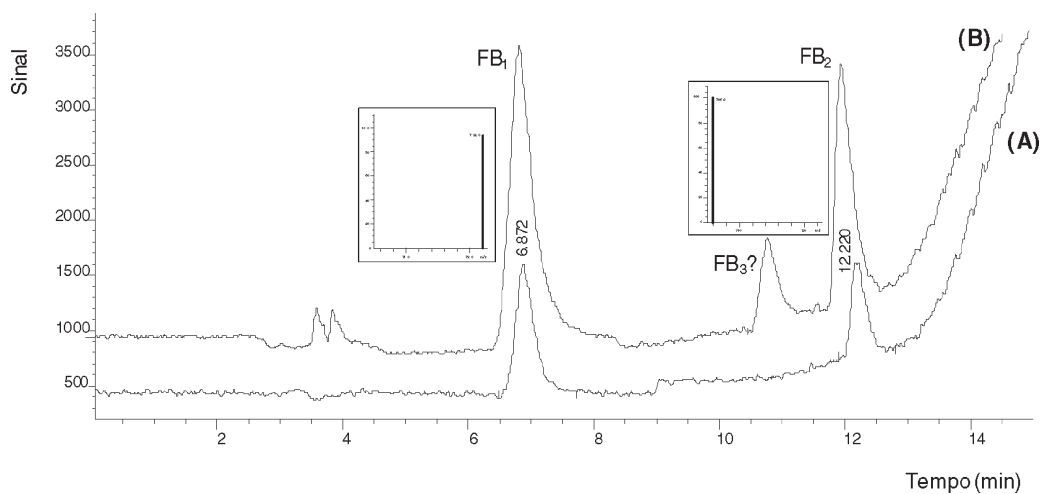


Figura III.6 Cromatograma LC-MS de A: padrão de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ FB_1 e FB_2 ; B: amostra contaminada de farinha com $922 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 e $644 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_2 (tempo de retenção 6,87 e 12,22 min para a FB_1 e FB_2 , respectivamente).

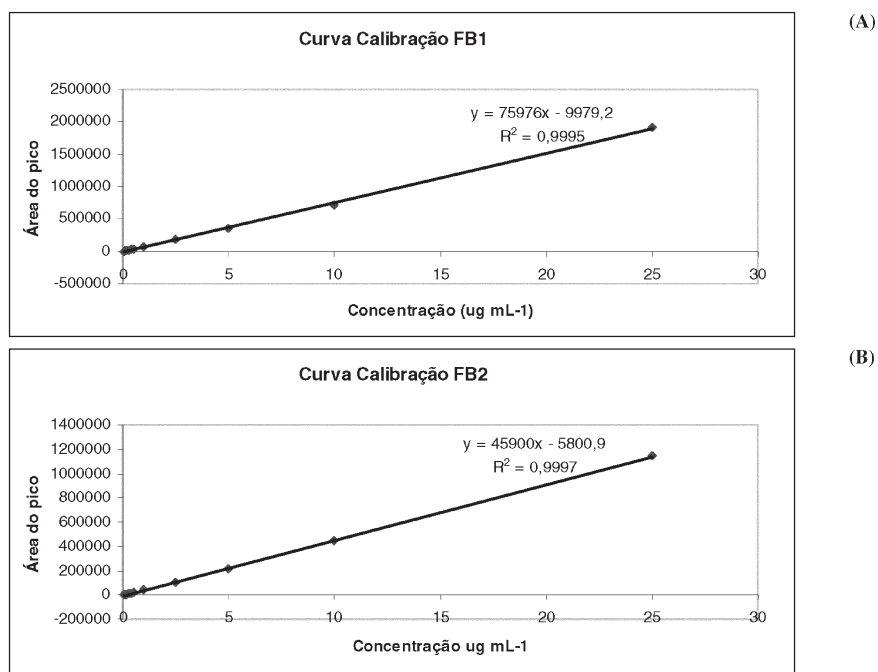


Figura III.7 Linearidade da FB_1 (A) e FB_2 (B) obtida por LC-ESI-MS avaliada entre 1 ng e 250 ng injectados.

As percentagens de recuperação para a FB₁ foram 94% e 98% para níveis de fortificação de 400 e 200 µg kg⁻¹, respectivamente. Para a FB₂ foram 98% e 99% para os níveis de fortificação anteriormente mencionados. No que respeita à repetibilidade intra-dia, o desvio padrão relativo (RSD) foi 7,8% para a FB₁ e 4,8% para a FB₂. Relativamente à repetibilidade inter-dia o RSD da FB₁ foi 11,2%, e da FB₂ 12%. O LOD, usando as condições anteriormente referidas, para um sinal-ruído de 3:1, foi de 50 µg kg⁻¹ para ambas as FBs (Tabela III.7).

Tabela III.7 Exactidão e resultados de validação intra-dia (n=3) e inter-dia (n=9) obtidos com o método otimizado para LC-ESI-MS para a matriz amido de milho.

FBs	Nível de fortificação (µg kg ⁻¹)	Média de recuperação (%)	RSD intra-dia (%)	RSD inter-dia (%)
FB ₁	200	98	7,8	11,2
	400	94	–	–
FB ₂	200	99	4,8	12,0
	400	98	–	–

III.4.1.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECÇÃO POR MASSA-MASSA

As condições do detector foram optimizadas por infusão contínua de uma solução padrão (10 µg mL⁻¹) através de uma válvula de infusão directa com um fluxo de 10 µL min⁻¹.

Em LC-MS-MS, a aquisição de dados foi efectuada em ambos os modos, SIM e *multiple reaction monitoring* (MRM). As condições usadas no modo SIM foram idênticas às usadas no quadrupolo simples, a massa dos iões [M+H]⁺ foi seleccionada pelo primeiro quadrupolo e fragmentada pelo segundo, produzindo iões produto correspondentes à perda sequencial de água e das cadeias laterais de ácido tricarbóxico (TCA). De acordo com o espectro obtido por *scan* completo em MS-MS, dois pares possíveis de transição foram seleccionados para aquisição no modo MRM. A Figura III.8 mostra o espectro dos iões produto das FBs obtidos com QqQ e na Tabela III.8 apresentam-se os iões

precursores e produto bem como as voltagens de cone e energias de colisão optimizadas usadas em MRM. Para a detecção de FB₁ o ião precursor foi m/z 722, sendo os iões produto seleccionados m/z 352 e 334. Para a FB₂, o ião precursor foi m/z 706, e os iões produto m/z 318 e 336.

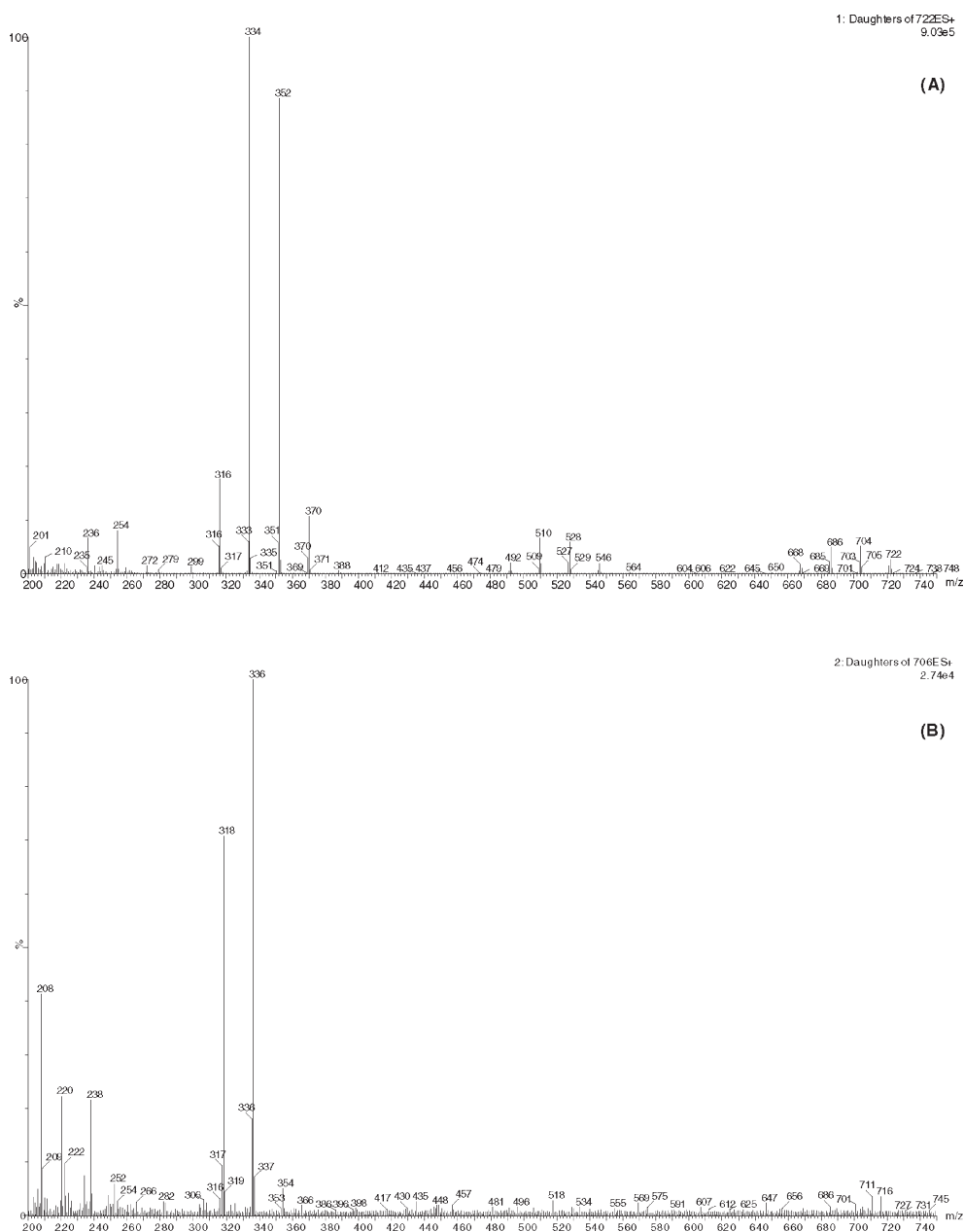


Figura III.8 Espectro dos iões produto da FB₁ (A) e FB₂ (B) obtidos com QqQ.

Tabela III.8 Iões estudados, voltagens de cone e energias de colisão usadas em LC-MS-MS.

Fumonisina	Ião precursor (m/z)	Iões produto (m/z)	Voltagem de cone (V)	Energia de colisão (eV)
FB ₁	722	352 - [M+H-2TCA-H ₂ O] ⁺	50	40
		334 - [M+H-2TCA-2H ₂ O] ⁺		
FB ₂	706	336 - [M+H-2TCA-H ₂ O] ⁺	50	35
		318 - [M+H-2TCA-2H ₂ O] ⁺		

A LC-MS é actualmente considerada pelas autoridades competentes como uma metodologia analítica única na confirmação de analitos e na análise de resíduos, tendo em conta os regulamentos e procedimentos legais exigidos. Com este propósito, critérios de identificação foram recentemente propostos pela Comissão Europeia estando baseados num sistema de pontos de identificação. Por exemplo, um ião precursor e dois iões produto, sendo este rácio o requerimento mínimo para uma identificação inequívoca do analito por LC-MS-MS (Zölner e Mayer-Helm, 2006). Assim, com base na confirmação dos iões precursores, dois ou mais iões produto devem ser seleccionados de acordo com as recomendações da UE, o que corresponde a 4 pontos de identificação (um ião precursor e dois iões produto) (Commission Decision, 2002/657/EC).

A Figura III.9 mostra um cromatograma de LC-MS-MS de uma amostra orgânica de farinha de milho contaminada com 258 µg kg⁻¹ de FB₁ e 156 µg kg⁻¹ de FB₂. Um segundo pico foi observado em algumas amostras para os mesmos iões produto da FB₂ que alguns autores identificam como sendo FB₃ (Faberi *et al.*, 2005), no entanto, tal não pôde ser confirmado dado não se possuir padrão desta fumonisina.

Tal como para LC-MS, os solventes usados na fase móvel foram o metanol e a água, ambos adicionados de ácido fórmico, testando diferentes gradientes. Após optimização, a FB₁ e a FB₂ foram determinadas e quantificadas usando o seguinte gradiente: A-água:0,5% ácido fórmico 35% e B-metanol:0,5% ácido fórmico 65%, isocrática durante 3 min, alterando linearmente depois para 25% A e 75% B em 4 min, mantendo constante por 3 min. Finalmente, as condições iniciais foram mantidas durante 10 min. O fluxo usado foi de 0,3 mL min⁻¹.

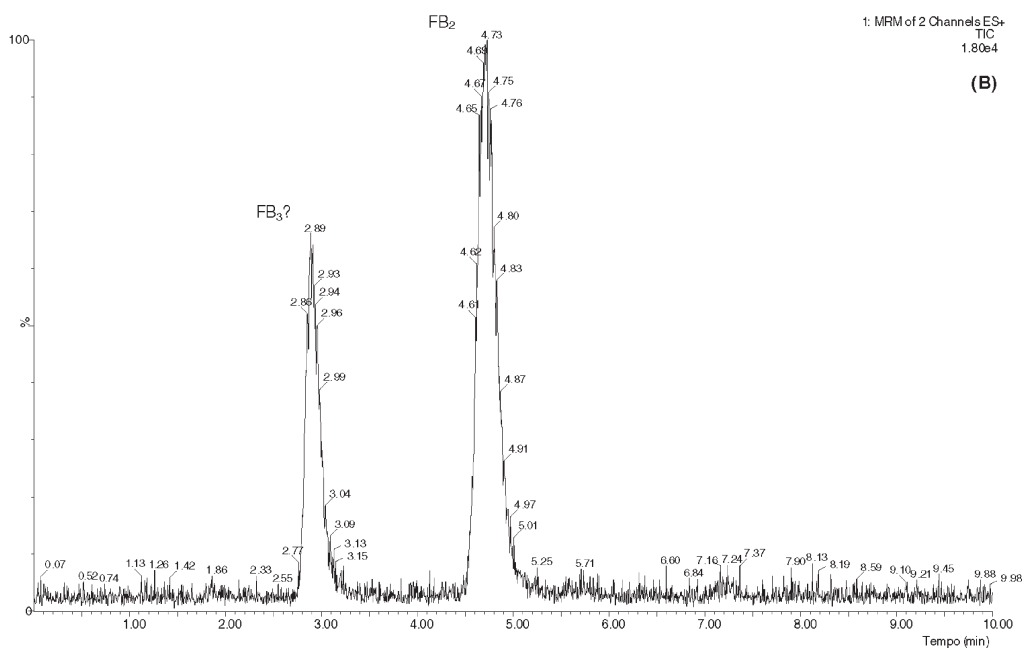
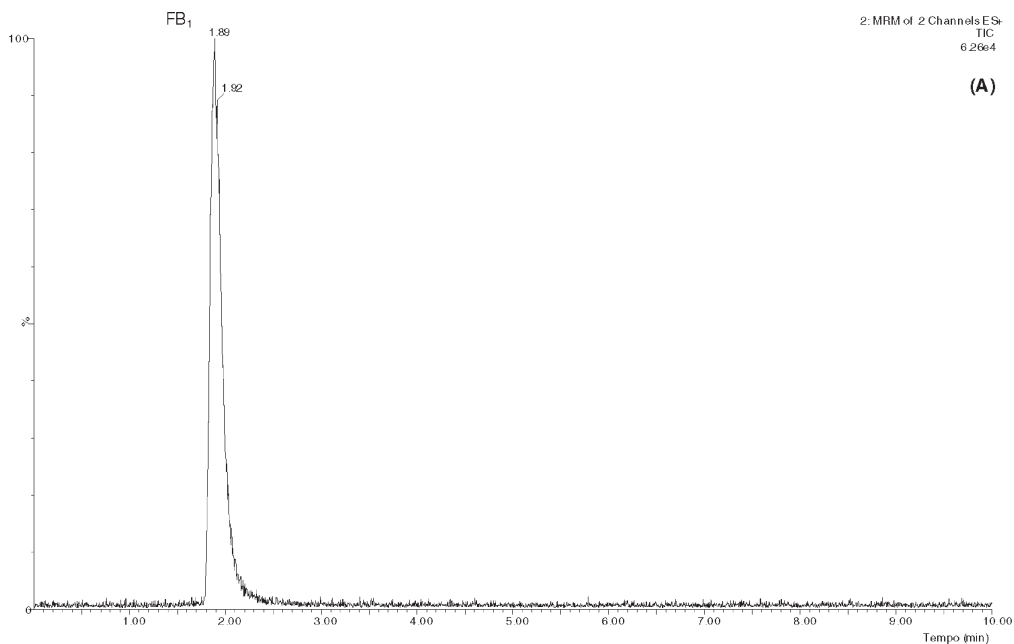


Figura III.9 Cromatograma QqQ MRM de uma amostra orgânica de farinha de milho contaminada com $258 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 (A) e $156 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_2 (B).

O método foi linear para ambas as FBs no intervalo de $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($r^2 = 0,9994$ para a FB_1 e $0,9962$ para a FB_2) (Figura III.10).

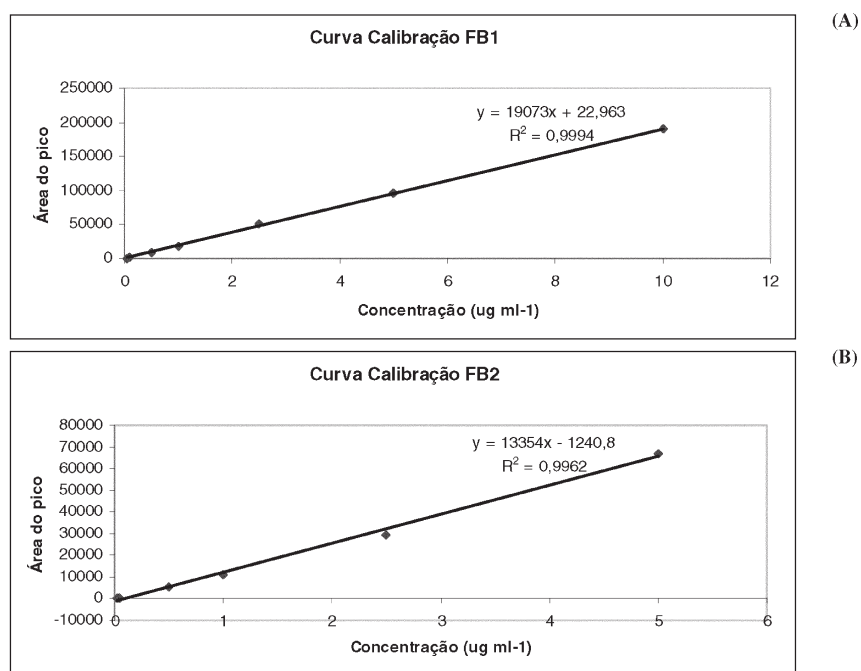


Figura III.10 Linearidade da FB₁ (A) e FB₂ (B) obtida por LC-ESI-MS-MS avaliada entre 0,25 ng e 100 ng injectados.

Os valores de recuperação para FB₁ foram 102% e 97% para níveis de fortificação de 400 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, para a FB₂ foram 101% e 81%, para os mesmos níveis de fortificação. A precisão foi avaliada no mesmo dia (precisão intra-dia) e em 3 dias diferentes (precisão inter-dia). Relativamente à precisão intra-dia, o desvio padrão relativo (RSD) foi de 1,7% para a FB₁ e de 1,9% para a FB₂. O RSD para a precisão inter-dia foi, para a FB₁ de 8,3%, para a FB₂ foi de 9,6%. O limite de detecção foi de 12,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ambas as FBs (Tabela III.9).

Tabela III.9 Exactidão e resultados de validação intra-dia (n=3) e inter-dia (n=9) obtidos com o método optimizado para LC-ESI-MS-MS para a matriz amido de milho.

FBs	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média de recuperação (%)	RSD intra-dia (%)	RSD inter-dia (%)
FB ₁	200	97	1,7	8,3
	400	102	–	–
FB ₂	200	81	1,9	9,6
	400	101	–	–

III.4.1.5. COMPARAÇÃO ENTRE LC-FD, LC-MS E LC-MS-MS

Uma validação cruzada entre as metodologias de LC-MS e LC-FD foi referenciada apenas uma vez, mostrando consenso entre ambas as técnicas (Zollner e Mayer-Helm, 2006).

Os parâmetros de validação como limites de detecção (LODs), limites de quantificação (LOQs), precisão intra-dia e inter-dia das três técnicas analíticas foram estudados e comparados. A Tabela III.10 e a Tabela III.11 mostram os resultados obtidos por LC-FD, LC-MS e LC-MS-MS. Estes parâmetros foram estabelecidos usando diferentes modos de aquisição de dados como SIM em LC-MS e MRM em LC-MS-MS.

Os três detectores exibiram respostas lineares no intervalo de 0,025 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o que corresponde a 0,25 ng e 250 ng injectados, respectivamente. As curvas de calibração para ambos os compostos apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,994, excepto para a FB_1 com LC-FD.

As recuperações médias de FB_1 e FB_2 após fortificação de brancos de amostras a diferentes níveis (Tabela III.11) variaram entre 79% e 102% com um desvio padrão que variou entre 9% e 17%. Os resultados obtidos com as três técnicas analíticas foram semelhantes e estão de acordo com os valores estabelecidos pela Comissão Europeia que recomenda recuperações entre 60 a 120% para a FB_1 e FB_2 para níveis de fortificação inferiores ou iguais a 500 ng g^{-1} (2005/38/EC e EC N.º 401/2006).

A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD). Os melhores valores foram obtidos aquando da utilização do triplo quadrupolo, no modo de aquisição MRM, tendo variado entre 1,7% (FB_1) e 1,9% (FB_2) para a precisão intra-dia e entre 8,3% (FB_1) e 9,6% (FB_2) para a precisão inter-dia.

Os LODs e os LOQs foram estabelecidos como a quantidade de analito que produz um sinal-ruído 3:1 e 10:1 respectivamente. Os LODs para a FB_1 e FB_2 , conseguidos com as três técnicas, foram diferentes. Os LODs mais baixos para ambas as FBs foram conseguidos com LC-MS-MS, 12,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, seguindo-se os obtidos por LC-FD, 20 e 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a FB_1 e FB_2 respectivamente, e finalmente os conseguidos por LC-MS, 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Devem considerar-se

volumes de amostra injectados de 10 µL com os detectores de massa e 25 µL com o detector de fluorescência. No entanto todos os limites de detecção são considerados satisfatórios considerando os limites máximos inicialmente estabelecidos pela Comissão Europeia em 2006 (EC N.º 1881/2006) e também os actualmente fixados pela directiva EC N.º 1126/2007.

Deste modo, a instrumentação LC-MS-MS, a metodologia analítica apresentou-se a mais precisa, exacta e sensível.

Como se pode observar na Figura III.5, os cromatogramas de LC-FD apresentam picos interferentes próximos do tempo de retenção da FB₁ e, por outro lado, este tipo de detecção necessita da prévia derivatização dos extractos antes da separação analítica, o que implica maior tempo de análise e traz uma dependência temporal no que respeita à estabilidade dos derivados. Estes obstáculos podem ser ultrapassados pela aplicação quer de LC-MS quer de LC-MS-MS.

Com os detectores MS, pode observar-se efeito matriz que é geralmente provocado por componentes interferentes dos extractos que eluem no mesmo tempo de retenção do analito, competindo por isso, no processo de ionização. Deste modo, o número de iões formado poderá aumentar ou diminuir, resultando um efeito matriz positivo ou negativo, respectivamente. Neste estudo, o efeito matriz foi avaliado por comparação da resposta dos detectores aquando da injeção das soluções padrão com os extractos da matriz fortificados a dois níveis diferentes. Concluiu-se que o efeito matriz para ambas as FBs no modo de ionização positivo é insignificante ou mesmo negligenciável.

Tabela III.10 Dados relativos às curvas de calibração obtidas com as diferentes técnicas.

	FBs	Coefficiente de correlação (r^2)	Curva de calibração
LC-FD	FB ₁	0,984	$y = 675254x + 299957$
	FB ₂	0,994	$y = 608365x - 112296$
LC-MS	FB ₁	0,9995	$y = 75976x - 9979,2$
	FB ₂	0,9997	$y = 45900x - 5800,9$
LC-MS-MS	FB ₁	0,9994	$y = 19073x + 22,963$
	FB ₂	0,9962	$y = 13354x - 1240,8$

Tabela III.11 Limites de detecção (LODs) e quantificação (LOQs) e exactidão obtidos para a FB₁ e FB₂ por cromatografia líquida usando os detectores de FD, MS e MS-MS.

FBs	LODs ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			LOQs ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			Recuperações médias (%)			
	FD	MS	MS-MS	FD	MS	MS-MS	Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	FD	MS	MS-MS
FB ₁	20	50	12,5	90	110	35	150	79	–	–
							200	–	98	97
							250	99	–	–
							400	–	94	102
FB ₂	15	50	12,5	45	110	35	100	98	–	–
							200	99	99	81
							400	–	98	101

– não efectuado

III.4.2. OCORRÊNCIA DE FBs NAS AMOSTRAS ANALISADAS

III.4.2.1. MILHO E ALIMENTOS DERIVADOS

A metodologia analítica optimizada foi aplicada com sucesso a 67 amostras de milho e alimentos derivados de milho como farinha, sémola, amido, milho doce, cornflakes e outros cereais de pequeno-almoço, e snacks, adquiridas em Portugal.

A presença de FBs foi verificada em 15 amostras (22,4%). As amostras revelaram níveis de contaminação que variaram entre não detectado (n.d.) e 1569 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₁ e entre n.d. e 457 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₂. Em todos os tipos de matrizes estudadas os níveis de contaminação de FB₂ foram inferiores aos de FB₁, facto que também se verifica em outros estudos publicados na literatura científica (Scudamore e Patel, 2000; Domijan *et al.*, 2005). Os dados quantitativos para a FB₁ e para a FB₂ determinados nas matrizes acima referidas apresentam-se na Tabela III.12 bem como na Figura III.11.

Todas as amostras contaminadas e suspeitas foram reanalisadas por LC-ESI-MS, tendo a presença de FB₁ e de FB₂ sido confirmada.

Tabela III.12 Prevalência e níveis de FBs em milho e produtos derivados adquiridos em Portugal.

Tipo de amostra	Nº de amostras analisadas	Nº (%) de amostras positivas	FB ₁		FB ₂		FB ₁ +FB ₂		FB ₁ /FB ₂ rácio
			Média ± SD (µg kg ⁻¹)	Máximo (µg kg ⁻¹)	Média ± SD (µg kg ⁻¹)	Máximo (µg kg ⁻¹)	Média ± SD (µg kg ⁻¹)	Máximo (µg kg ⁻¹)	
Milho amarelo	9	6 (67)	322±344	871	99±106	272	421±441	1061	3,25
Milho branco	2	2 (100)	363±513	725	275±229	437	638±742	1162	1,32
Total amostras milho	11	8 (72,7)	329±349	871	131±139	437	460±467	1162	2,5
Farinha de milho	3	2 (67)	822±787	1569	173±248	457	995± 1013	2026	4,75
Sémola de milho	3	2 (67)	118±102	183	-	-	118±102	183	-
Amido de milho	3	0 (0)	-	-	-	-	-	-	-
Milho doce	11	2 (18)	64±162	523	-	-	64±162	523	-
Cornflakes	16	0 (0)	-	-	-	-	-	-	-
Cereais mistos	4	0 (0)	-	-	-	-	-	-	-
Snacks de milho	16	1 (6)	10,6±43	171	5,6±22	90	16±65	261	1,9

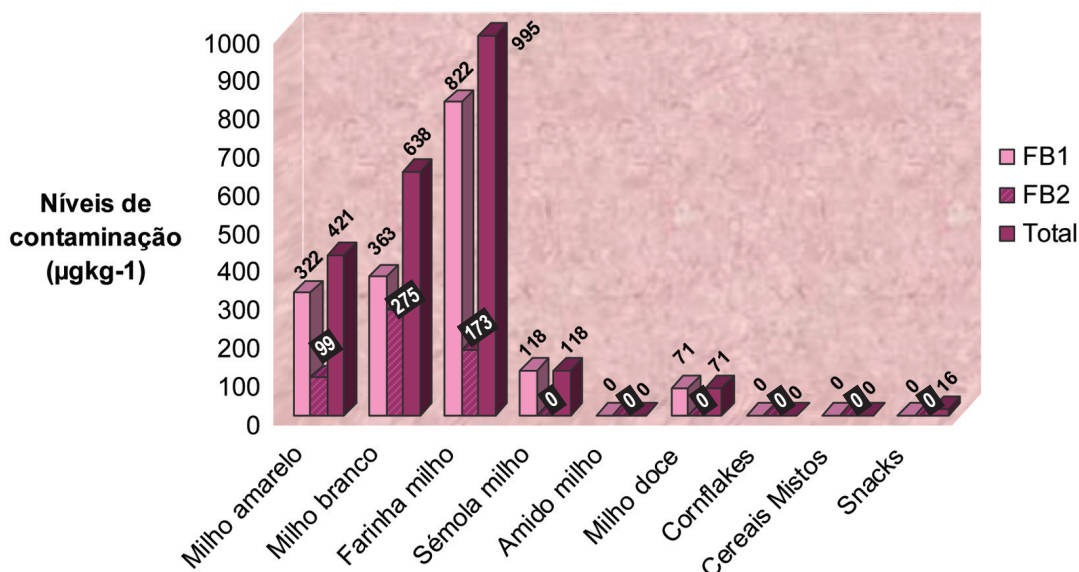


Figura III.11 Gráfico representativo dos níveis médios de contaminação de FB₁ e FB₂ em milho e em produtos à base de milho em Portugal.

Neste estudo, 72,7% do total das amostras de milho encontravam-se contaminadas com FBs, correspondendo a 67% das amostras de milho amarelo e a 100% das de milho branco (Tabela III.12). Este facto corrobora o único estudo conhecido em Portugal para a FB₁ e para FB₂ em nove amostras de milho híbrido naturalmente contaminado, originadas na colheita de 1992 da Escola Agrícola de Coimbra (Doko *et al.*, 1995). As concentrações médias encontradas no presente estudo foram, para a FB₁, 322 µg kg⁻¹ e 363 µg kg⁻¹, em milho amarelo e branco, respectivamente. Para a FB₂, as concentrações médias foram 99 µg kg⁻¹ e 275 µg kg⁻¹, em milho amarelo e branco, respectivamente. Estes valores são muito inferiores quando comparados com os obtidos em 1992, 1031 µg kg⁻¹ para a FB₁ e 1077 µg kg⁻¹ para a FB₂ (Doko *et al.*, 1995).

As amostras de milho branco, usadas na preparação de *cachupa* um prato tradicional de Cabo Verde, apresentaram níveis de contaminação mais elevados para o total de FBs do que as amostras de milho amarelo, 638 µg kg⁻¹ *versus* 421 µg kg⁻¹.

Uma pesquisa de FBs em milho e produtos derivados de diferentes países mostrou uma elevada incidência e elevados níveis de contaminação (Tabela III.13).

Tabela III.13 Ocorrência de FBs em milho e produtos derivados.

Tipo de amostra	País	FBs		Referências
		Incidência	Níveis contaminação (µg kg ⁻¹)	
Híbridos de milho	Portugal	Total: 100%	FB ₁ : 1031 FB ₂ : 1077	Doko <i>et al.</i> , 1995
Milho	Espanha	Total: 87,3%	FB ₁ : 4800 FB ₂ : 1900	Castellá <i>et al.</i> , 1999
Milho	Marrocos	FB ₁ : 50%	FB ₁ : 1930 (n.d. – 5960)	Zinedine <i>et al.</i> , 2005
Milho	Reino Unido		FB ₁ : 3406 FB ₂ : 1268	Scudamore e Patel, 2000
Milho	Nigéria	Total: 78,6%	FB ₁ : 495 FB ₂ : 114	Bankole e Mabekeje, 2004
Milho	Brasil	Total: 100%	FB ₁ : 1890 FB ₂ : 700	Westhuizen <i>et al.</i> , 2003
Milho	China		FB ₁ : 280 – 1420	Wang <i>et al.</i> , 2008
Farinha	França		FB ₁ : 1113	Molinié <i>et al.</i> , 2005
Farinha e cereais wholemeal	Itália		FB ₁ : 10 – 2870 FB ₂ : 10 – 420	Cirillo <i>et al.</i> , 2003a
Farinha	Brasil	Total: 100%	FB ₁ : 2100 FB ₂ : 700	Bittencourt <i>et al.</i> , 2005
Farinha	Argentina		FB ₁ : 109 – 1600 FB ₂ : 122	Broggi <i>et al.</i> , 2002
Sémola	Uruguai		FB ₁ : 105 FB ₂ : n.d.	Piñeiro <i>et al.</i> , 1997
Sémola	Suíça	FB ₁ : 61,8% FB ₂ : 23,6%	FB ₁ : 260 FB ₂ : 100	Pittet <i>et al.</i> , 1992
Sémola	Argentina	Total: 100%	FB ₁ : 135 FB ₂ : 39,1	Broggi <i>et al.</i> , 2002
Amido	Uruguai		FB ₁ : n.d. FB ₂ : n.d.	Piñeiro <i>et al.</i> , 1997
Milho doce/congelado		FB ₁ : 38%	FB ₁ : 70 – 90	Truckess <i>et al.</i> , 1995
Milho doce	Suíça	FB ₁ : 14,3%	FB ₁ : 70 FB ₂ : n.d.	Pittet <i>et al.</i> , 1992
Milho doce/congelado	Uruguai	FB ₁ : 1	FB ₁ : 65	Piñeiro <i>et al.</i> , 1997
Cornflakes	África do Sul EUA	Total: 0%	Total: n.d.	Sydenham <i>et al.</i> , 1991
Cornflakes	Suíça	FB ₁ : 1/12 FB ₂ : 0/12	FB ₁ : 55 FB ₂ : n.d.	Pittet <i>et al.</i> , 1992
Cornflakes	Uruguai		FB ₁ : n.d. – 218 FB ₂ : n.d.	Piñeiro <i>et al.</i> , 1997
Cornflakes/cereais pequeno-almoço		FB ₁ : 14/15 FB ₂ : 2/15	FB ₁ : 13 – 237 FB ₂ : 21 – 23	Park <i>et al.</i> , 2004

Tabela III.13 Ocorrência de FBs em milho e produtos derivados (*continuação*).

Tipo de amostra	País	FBs		Referências
		Incidência	Níveis contaminação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
Comflakes	Taiwan	FB ₁ : 3,5% FB ₂ : 17,6%	FB ₁ : 140 – 1281 FB ₂ : 120 – 466	Tseng e Liu, 1997
Cereais pequeno-almoço			FB ₁ : 1 – 1110	Molinié <i>et al.</i> , 2005
Milho processado termicamente		HFB ₁ : 100%	HFB ₁ : 24 – 418	Park <i>et al.</i> , 2004
Comflakes		FB ₁ : 22/25 FB ₂ : 12/25	FB ₁ : 68 FB ₂ : 8	Kim <i>et al.</i> , 2003
Snacks	EUA	Total: 1/6	Total: 250	Pohland, 1996
Snacks	Espanha		FB ₁ : n.d. – 200	Sanchis <i>et al.</i> , 1994
Snacks	Reino Unido	Total: 31/40	Total: 11 – 220	Patel <i>et al.</i> , 1997
Snacks	Países Nórdicos	FB ₁ : 6/10 FB ₂ : 3/10	FB ₁ : 2 – 65 FB ₂ : 4 – 8	Peterson e Thorup, 2001
Snacks	Taiwan	FB ₁ : 33% FB ₂ : 21%	FB ₁ : n.d. – 2395 FB ₂ : n.d. – 715	Tseng e Liu, 1997

Os níveis de contaminação médios de FB₁ e FB₂ encontrados no total das amostras de milho, 329 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₁ e 131 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₂, são inferiores aos observados em Espanha, Reino Unido e Marrocos (Castélla *et al.*, 1999; Domijan *et al.*, 2005; Zinedine *et al.*, 2005). No entanto, a percentagem de amostras positivas encontrada no nosso estudo (72,7%) é semelhante à observada em Espanha (Castélla *et al.*, 1999).

Em milho de Espanha a incidência foi de 87,3% com um nível de contaminação médio para a FB₁ de 4800 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 1900 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₂ (Castellá *et al.*, 1999). Em Marrocos, a percentagem de amostras positivas para a FB₁ foi 50%, com um nível médio de contaminação de 1930 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₁, sendo o valor mais alto de 5960 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Zinedine *et al.*, 2005). Em milho importado para o Reino Unido, a concentração máxima encontrada foi de 3406 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₁ e 1268 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₂ (Scudamore e Patel, 2000). Na Nigéria, as FBs foram detectadas em 78,6% das amostras de milho, estando referenciados níveis similares (495 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₁ e 114 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₂) aos do presente estudo, sendo também a FB₁ a toxina predominante (Bankole e

Mabekoje, 2004). O mesmo aconteceu no Brasil, estando a FB₁ e a FB₂ presentes em todas as amostras de milho (Westhuizen *et al.*, 2003). Na China, em 2008, observou-se que a FB₁ variou entre 280 e 1420 µg kg⁻¹ em milho proveniente de diferentes fontes, entre elas supermercados e colheitas caseiras (Wang *et al.*, 2008).

Neste estudo as amostras de farinha de milho apresentaram a mais elevada concentração média de FB₁, 822 µg kg⁻¹, com um valor máximo de 1569 µg kg⁻¹, sendo a concentração máxima total de FBs 2026 µg kg⁻¹. A FB₂ apresentou um valor médio de 173 µg kg⁻¹. Valores mais elevados foram observados em França, Itália e Brasil, enquanto que na Argentina a concentração média de FB₁ e FB₂ foi inferior (Molinié *et al.*, 2005; Cirillo *et al.*, 2003a; Bittencourt *et al.*, 2005; Broggi *et al.*, 2002). Molinié *et al.* (2005) encontraram 1113 µg kg⁻¹ de FB₁ em cereais de pequeno-almoço do mercado francês, feitos exclusivamente com farinha de milho. Em Itália, Cirillo *et al.* (2003a) encontraram, em farinha e cereais *wholemeal*, níveis que oscilaram entre 10 e 2870 µg kg⁻¹ para a FB₁, e entre 10 e 420 µg kg⁻¹ para a FB₂. Foi também observado que todas as amostras de farinha de milho analisadas em São Paulo, Brasil, se encontravam contaminadas por FB₁ e FB₂. Os valores médios foram 2100 e 700 µg kg⁻¹, para a FB₁ e FB₂, respectivamente (Bittencourt *et al.*, 2005). Na Argentina, Broggi *et al.* (2002) referiram valores médios de 358 e 122 µg kg⁻¹ para a FB₁ e FB₂, respectivamente. Neste estudo a FB₁ oscilou entre 109 to 1600 µg kg⁻¹.

Relativamente à sémola de milho, 67% das amostras foram positivas para a FB₁, com um nível de contaminação médio de 118 µg kg⁻¹. A FB₂ não foi detectada em nenhuma amostra desta matriz. Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados no Uruguai, na Suíça e na Argentina (Piñeiro *et al.*, 1997; Pittet *et al.*, 1992; Broggi *et al.*, 2002). Piñeiro *et al.* (1997) encontraram uma média de 105 µg kg⁻¹ para a FB₁, enquanto que a FB₂ não foi detectada nas amostras de sémola provenientes do Uruguai. Na Suíça, Pittet *et al.* (1992) mostraram que 61,8% das amostras de sémola de milho estavam contaminadas com 260 µg kg⁻¹ de FB₁ e 23,6% contaminadas com 100 µg kg⁻¹ de FB₂.

Broggi *et al.* (2002), na Argentina, encontraram $135 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 e $39,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_2 nas 12 amostras de sémola de milho analisadas.

Não foram detectadas FBs nas amostras de amido de milho. A moagem húmida usada na produção do amido conduz a perdas que podem explicar estes resultados, uma vez que durante este processo se observa migração das FBs para a solução aquosa durante a fase de *steeping* (Bolger *et al.*, 2001). A análise das fracções obtidas à escala laboratorial da moagem húmida de milho contaminado com FBs revelou que as fracções de amido não continham quantidades mensuráveis de FB_1 (Fumonisins – JECFA, 2001) o que comprova a migração das FBs para a solução aquosa (EMAN Basic Fact Sheet 5 Fumonisins). Piñeiro *et al.* (1997) também não detectaram FB_1 e FB_2 nas amostras de amido de milho do Uruguai.

As amostras da matriz de milho doce apresentaram baixos níveis de contaminação, $64 \mu\text{g kg}^{-1}$ em 18% das amostras analisadas para a FB_1 , sem que fosse detectada FB_2 . A redução dos níveis de FBs pode dever-se à migração das mesmas para a solução aquosa devido à sua elevada solubilidade em água (Truckess *et al.*, 1995), à temperatura elevada usada para o enlatamento (Arranz *et al.*, 2004) ou a um controlo mais rigoroso aquando da selecção deste milho. Baixos níveis de contaminação foram também referidos por outros autores (Pittet *et al.*, 1992; Truckess *et al.*, 1995). Truckess *et al.* (1995) determinaram a presença de FB_1 em milho enlatado e congelado, tendo observado que apenas 38% das amostras foram positivas com um nível médio de contaminação de $70 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o milho enlatado e $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o milho congelado. A análise de milho doce proveniente do mercado suíço mostrou que a FB_1 foi detectada em 14,3% das amostras com uma concentração média de $70 \mu\text{g kg}^{-1}$ enquanto que a FB_2 não foi encontrada (Pittet *et al.*, 1992). Em 1997, Piñeiro *et al.*, no Uruguai, apenas detectou FB_1 em uma das amostras analisadas de milho congelado e enlatado com um nível de contaminação de $65 \mu\text{g kg}^{-1}$.

No que respeita aos cereais de pequeno-almoço, nenhuma das amostras de cornflakes ou de cereais mistos apresentou FBs. Estes resultados estão de acordo com os publicados por Sydenham *et al.* (1991) e Pittet *et al.* (1992).

Os primeiros autores analisaram, entre outras amostras, cornflakes da África do Sul e EUA com o objectivo de estudar a contaminação de FBs em alimentos comerciais para consumo humano, não tendo encontrado amostras contaminadas. Pittet *et al.* (1992) estudaram a ocorrência de FB₁ e FB₂ em produtos derivados de milho do mercado suíço. Entre as 12 amostras de cornflakes analisadas, a FB₁ foi detectada em apenas uma com um nível de contaminação de 55 µg kg⁻¹, enquanto que a FB₂ não foi detectada.

No entanto, outros autores observaram elevados níveis de contaminação de FBs em cereais de pequeno-almoço. Os níveis de FB₁ em cornflakes do Uruguai variaram entre n.d. e 218 µg kg⁻¹, enquanto que a FB₂ não foi detectada (Piñeiro *et al.*, 1997). Park *et al.* (2004) verificaram que 14 das 15 amostras de cornflakes e outros cereais de pequeno-almoço à base de milho apresentavam níveis detectáveis de FB₁ numa concentração média de 67 µg kg⁻¹ (13 a 237 µg kg⁻¹). Duas amostras também continham níveis detectáveis de FB₂ (21 e 23 µg kg⁻¹). Tseng e Liu (1997) observaram uma incidência de FB₁ de 3,5% num intervalo de concentração de 140 e 1281 µg kg⁻¹, enquanto que a incidência de FB₂ foi de 17,6% num intervalo de concentração entre 120 e 466 µg kg⁻¹. Molinié *et al.* (2005) analisaram cereais de pequeno-almoço compostos por diversos tipos de cereais, incluindo milho, simples ou em mistura. O intervalo de contaminação foi de 1 a 1110 µg kg⁻¹ de FB₁. A amostra mais contaminada era composta exclusivamente por farinha de milho. Em duas amostras a FB₂ foi também detectada mas não quantificada.

Normalmente, os níveis de contaminação por FBs encontrados em cornflakes com origem em diferentes partes do mundo são considerados baixos, no entanto, amostras ocasionais com elevados níveis de contaminação foram encontradas (Kim *et al.*, 2003). Estes baixos níveis de contaminação encontrados em cornflakes e outros cereais de pequeno-almoço podem ser explicados pelo facto de os *flaking grits* apresentarem os níveis mais baixos de concentração de FBs relativamente a todas as outras fracções produzidas através da moagem seca comercial do milho (Kim *et al.*, 2003). Outra explicação consiste no facto de as FBs livres serem substancialmente perdidas aquando do processo

de extrusão dos *maize grits* e da farinha de milho, do *flaking* e *roasting* dos *maize grits* e de todo o processo de transformação da farinha de milho em cornflakes (Kim *et al.*, 2003; Girolamo *et al.*, 2001; Castells *et al.*, 2005). A adição de glicose resulta também numa grande redução de FB_1 aquando da extrusão dos *maize grits* e também durante o processo de aquecimento devido à sua ligação a polissacarídeos e proteínas (Park *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003).

No que respeita aos snacks, os níveis de contaminação referidos por diferentes autores são geralmente baixos, o que está de acordo com os nossos resultados. No nosso estudo verificou-se que de entre as 16 amostras analisadas apenas uma se encontrava contaminada com $171 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 e $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_2 num total de $261 \mu\text{g kg}^{-1}$ para ambas as FBs.

Nos EUA os níveis de contaminação totais em snacks foram de $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ com uma incidência de amostras positivas de 16,6% (Pohland, 1996). Em snacks de Espanha, a FB_1 foi encontrada num intervalo de n.d. a $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, com apenas duas amostras positivas (Sanchis *et al.*, 1994). Patel *et al.* (1997) determinaram um intervalo entre 11 e $220 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o total de FBs em snacks do Reino Unido, com uma incidência de 31/40. Nos países nórdicos, Peterson e Thorup (2001) referiram a presença de 2 a $65 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 em 6 de 10 amostras de snacks de milho e de 4 a $8 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_2 em 3 de 10 amostras. Apenas Tseng e Liu (1997) observaram níveis de contaminação mais elevados em snacks de milho do mercado de Taiwan. A FB_1 , com uma incidência de 33%, foi encontrada num intervalo de n.d. a $2395 \mu\text{g kg}^{-1}$, e a FB_2 , com uma incidência de 21% num intervalo de n.d. a $715 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tal como para os cornflakes, estes resultados podem ser explicados pelos processos de extrusão que estão na base da produção de snacks (Castells *et al.*, 2005), uma vez que para as temperaturas observadas, nos processos comerciais normais, as perdas verificadas são pequenas (Jackson *et al.*, 1997). A perda de FBs pode também resultar da reacção de acastanhamento não-enzimático que envolve o grupo amínico primário das FBs e os açúcares redutores dos alimentos e não da hidrólise das FBs (Jackson *et al.*, 1997).

Relativamente às amostras de milho adquiridas na zona Centro de Portugal, uma amostra de farinha de milho excedeu 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e uma amostra de milho doce excedeu 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, limites inicialmente propostos pela Comissão Europeia (EC N.º 856/ /2005 e EC N.º1881/2006). No entanto, de acordo com a legislação que vigora (EC N.º1126/2007) a amostra de milho doce já não excede os limites propostos, que foram aumentados para 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A amostra de farinha de milho também excedeu a concentração máxima permitida pela Suíça para o somatório de FB₁+FB₂, 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Shephard *et al.*, 2000).

Com o objectivo de avaliar a aplicabilidade da metodologia optimizada de LC-MS-MS, esta foi aplicada à análise de 41 amostras de alimentos derivados do milho adquiridos no mercado de Valência (Tabela III.14, Figura III.12). De entre as amostras analisadas, apenas 7 (17%) se encontravam contaminadas, sendo a amostra mais contaminada de farinha de milho. Nesta matriz, a FB₁ foi detectada num intervalo de concentração que variou entre 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 922 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com um valor médio de 252 $\mu\text{g kg}^{-1}$, a FB₂ foi detectada em concentrações que variaram 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 640 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com um valor médio de 186 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Os níveis de contaminação encontrados neste estudo estão de acordo com outros estudos realizados em produtos adquiridos no mercado espanhol (Ariño *et al.*, 2007b), apesar da percentagem de amostras positivas encontrada ser menor, possivelmente devido ao tipo de produtos de milho analisado. No entanto, em 1997, foram encontrados valores muito superiores para a FB₁ em milho, com uma incidência também superior (Castellá *et al.*, 1999).

De entre as amostras adquiridas em Valência, 15 eram de origem orgânica (6 farinha de milho, 1 couscous, 3 pão de milho, 4 cornflakes e 1 gofio). Destas, 4 amostras de farinha e a amostra de couscous apresentavam-se contaminadas com ambas as FBs.

De entre as 26 amostras não orgânicas, apenas uma amostra de farinha de milho e uma amostra de snacks se apresentaram contaminadas com FB₁+FB₂ e FB₁, respectivamente.

Quanto às matrizes adquiridas e analisadas em Valência, verificou-se que os limites estabelecidos para a soma da FB₁+FB₂ pela Comissão Europeia em

2006 e 2007 para alimentos à base de milho para consumo humano directo, $1000\mu\text{g kg}^{-1}$, foram excedidos em cerca de 56% por uma amostra de farinha de milho (o que corresponde a 2,4% da amostragem), contaminada com um total de FB_1+FB_2 de $1562 \mu\text{g kg}^{-1}$. Provavelmente, a incidência e os níveis de contaminação de FBs encontrados em produtos derivados do milho são baixos, porque os padrões de qualidade e segurança alimentar são tidos como uma boa prática na agricultura e na manufactura (Comission Directive 2006/583/EC).

Apenas alguns estudos comparam os níveis de FBs em produtos orgânicos e não-orgânicos. No presente estudo a percentagem de amostras orgânicas contaminadas (33,3%) foi superior à de amostras convencionais contaminadas (7,7%).

Estes resultados estão em contradição com outros estudos. Em alimentos de Itália a ocorrência de FB_1 em alimentos orgânicos foi de 20% e em alimentos convencionais foi de 31% (Cirillo *et al.*, 2003b). Ariño *et al.* (2007a) verificaram que 13% das amostras de milho convencional e 10% das amostras de milho orgânico se apresentavam contaminadas com FBs. Ariño *et al.* (2007b) ao analisarem 60 amostras de milho orgânico e convencional verificaram a presença de FBs em amostras convencionais em concentrações médias de 43 e 22 ng g^{-1} , para a FB_1 e FB_2 , respectivamente. Nas amostras orgânicas observaram contaminações médias de 35 e 19 ng g^{-1} , para a FB_1 e FB_2 , respectivamente. De acordo com estes autores, provavelmente, os processos usados na agricultura não têm uma importância decisiva na contaminação dos produtos agrícolas.

Tabela III.14 Prevalência e níveis de FBs em milho e produtos derivados adquiridos em Espanha.

Amostras	Nº Amostras	Nº amostras positivas	Intervalo contaminação FB_1 (μgkg^{-1})	Média FB_1 (μgkg^{-1})	Intervalo contaminação FB_2 (μgkg^{-1})	Média FB_2 (μgkg^{-1})
Farinha	9	5	250–922	252	150–640	186
Milho doce	6	0	–	–	–	–
Snacks	9	1	70	7,8	–	–
Cornflakes	11	0	–	–	–	–
Pão	3	0	–	–	–	–
Outros	3	1	71	23,7	42	14
Total	41	7	70–922	57	42–640	41

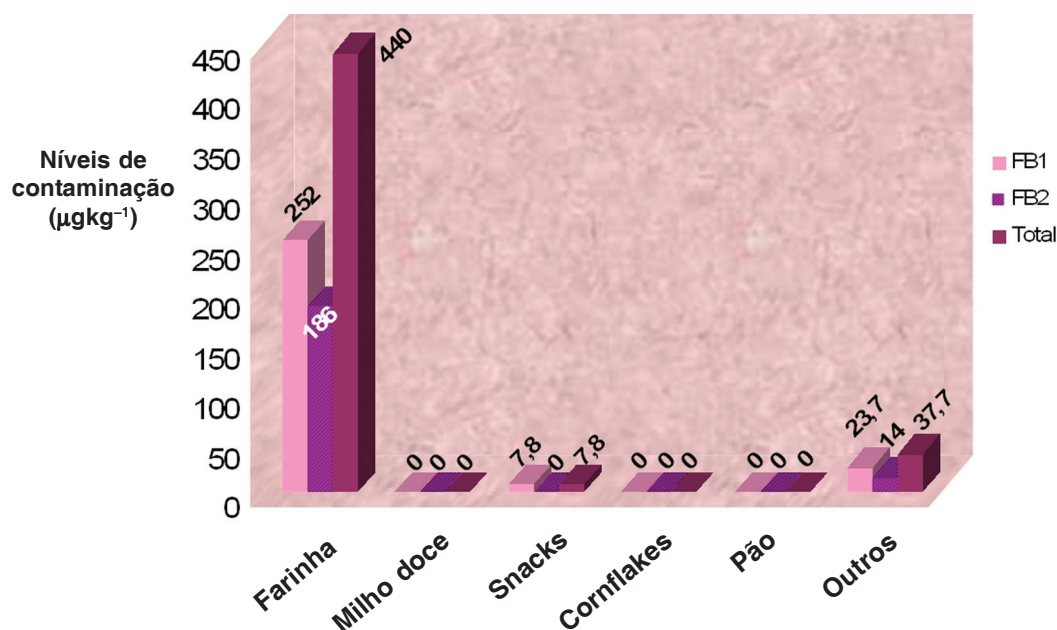


Figura III.12 Gráfico representativo dos níveis médios de contaminação de FBs em milho e em produtos à base de milho em Espanha.

III.4.2.2. BROA

A metodologia analítica otimizada para LC-FD foi também aplicada com sucesso a 30 amostras de broa. Para confirmação da presença de FBs procedeu-se à análise por cromatografia líquida com ionização por *electrospray* e detecção por massa (LC-ESI-MS). Verificou-se com este estudo que 24 amostras (80%) se encontravam contaminadas com FB₁, e 25 amostras (83%) com FB₂. As amostras analisadas apresentaram níveis de contaminação que variaram entre n.d. e 448 µg kg⁻¹ para a FB₁ e entre n.d. e 207 µg kg⁻¹ para a FB₂. As concentrações médias determinadas com o presente estudo foram 197 µg kg⁻¹ para a FB₁ e 77 µg kg⁻¹ para a FB₂. A contaminação média para o total de FB₁ e de FB₂ foi 274 µg kg⁻¹, a amostra mais contaminada apresentou uma contaminação de 550 µg kg⁻¹ para o total de FB₁ e de FB₂ (Tabela III.15; Figura III.13).

A concentração média de FB₂ foi inferior à de FB₁ (Tabela III.15; Figura III.13), facto que também se verifica noutros estudos (Scudamore e Patel, 2000; Domijan *et al.*, 2005).

Tabela III.15 Prevalência e níveis de FBs em broa de Portugal.

	No (%) de amostras positivas	Intervalo de contaminação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média \pm SD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Mediana ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
FB ₁	24 (80)	n.d. – 448	197 \pm 130	205
FB ₂	25 (83)	n.d. – 207	77 \pm 60	70
FBs	25 (83)	n.d. – 550	274 \pm 267	266

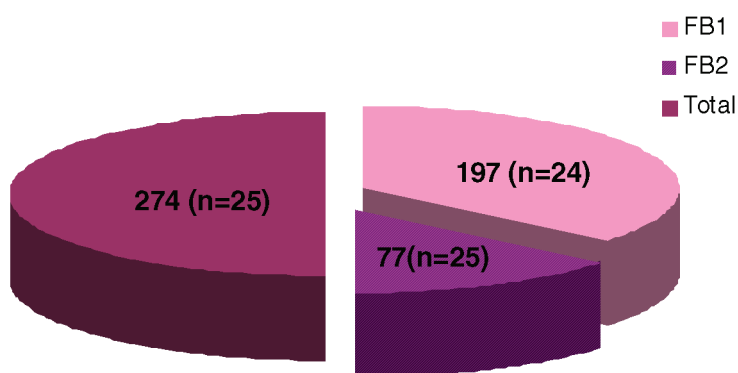


Figura III.13 Níveis médios ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e incidência (n=30) de FBs em broa em Portugal.

No que respeita à matriz broa, para a FB₁ e para o total de FB₁ e de FB₂, duas e oito amostras, respectivamente, excederam o limite máximo proposto pela Comissão Europeia em 2005 e fixado em 2006, 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No entanto com os valores fixados em 2007, nenhuma amostra excedeu os limites actualmente propostos, 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Teores de 125 a 448 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB₁ e de 16 a 207 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB₂ em amostras de broa portuguesa contaminadas sugere que o conteúdo de FBs na farinha de milho usada seria bastante elevado, o que foi confirmado na investigação prévia realizada em milho, farinha de milho e outros alimentos à base de milho para a determinação FB₁ e de FB₂. Neste estudo aplicado a 67 amostras de milho e alimentos à base de milho verificou-se a presença de FBs em 15 amostras (22,4%). As amostras analisadas apresentaram elevados níveis de contaminação, n.d. e 1569 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB₁ e entre n.d. e 457 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para

a FB₂. Setenta e três por cento das amostras de milho encontravam-se contaminadas por FBs com uma média de 329 µg kg⁻¹ de FB₁ e 131 µg kg⁻¹ de FB₂. Também se observou que a matriz farinha de milho, o principal ingrediente da broa, apresentou a concentração média mais elevada de FB₁, 822 µg kg⁻¹, enquanto que a FB₂ apresentou uma contaminação média de 173 µg kg⁻¹, estando uma amostra de farinha de milho contaminada com 2026 µg kg⁻¹ de FB₁ + FB₂ (Tabela III.12).

A nível europeu, tendo em conta o pequeno número de publicações relativas à contaminação por FBs neste tipo de alimentos, a comparação entre diferentes países é de alguma forma difícil.

Cirillo *et al.* (2003a) estudaram a co-ocorrência de desoxinivalenol, outra micotoxina produzida por *Fusarium spp.*, e FB₁ e FB₂ em matrizes alimentares do mercado italiano e verificaram que em pão a FB₁ se encontrava presente num intervalo que variou entre 30 e 150 µg kg⁻¹, com uma contaminação média de 50 µg kg⁻¹, enquanto que a FB₂ se observou num intervalo de 56 a 400 µg kg⁻¹, com uma contaminação média de 118 µg kg⁻¹. A comparação entre os dados portugueses, obtidos com o presente estudo, e os relativos a Itália revela que, no que respeita à FB₁ os níveis encontrados em broa são mais elevados do que os encontrados em pão italiano, contudo a contaminação por FB₂ em broa é inferior relativamente aos resultados italianos.

Sendo a broa um alimento à base de milho tipicamente português, a comparação com outros produtos similares oriundos de diferentes partes do mundo é difícil. No entanto, apesar dos processos de cocção da *tortilla* e da *polenta* serem completamente distintos do da broa, estes são também alimentos típicos do México e do norte de Itália, respectivamente, apesar de também serem consumidos noutros países.

A pesquisa de FBs durante 1990 e 1991 em *tortillas* dos EUA mostrou que a FB₁ e a FB₂ estavam presentes numa concentração média de 60 µg kg⁻¹ e 50 µg kg⁻¹, respectivamente (Sydenham *et al.*, 1991). Na fronteira Texas-México o nível médio de FB₁ encontrado em *masa* foi de 262 µg kg⁻¹, enquanto que em *tortillas*, foi encontrada num nível médio de 187 µg kg⁻¹ (Stack, 1998).

De acordo com Dombrink-Kurtzman e Dvorak (1999) seria expectável que o tratamento alcalino realizado na nixtamilização hidrolisasse a fumonisina nativa de modo a que apenas restasse a forma hidrolisada. No entanto, tal não se verificou e algumas das amostras mexicanas de *masa* e *tortilla* analisadas por estes autores continham 1000 a 1800 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 . Este facto pode ser explicado pela incompleta nixtamilização e/ou utilização de um processo de extrusão em vez de nixtamilização (Weidenbörner, 2001). Em 2000, Dombrink-Kurtzman *et al.* observaram que amostras de *tortilla* se apresentavam contaminadas com aproximadamente 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 e 360 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de HFB_1 , o que representa 18,5% da quantidade inicial de FB_1 em milho não processado, enquanto que a FB_2 foi reduzida em 10,7%, e concluíram que a nixtamilização reduz significativamente a quantidade destas micotoxinas em milho. Voss *et al.* (2001) e Palencia *et al.* (2003) observaram uma redução de 80% e 50%, respectivamente, no conteúdo de FBs em *tortillas* relativamente a milho não processado. Palencia *et al.* (2003) também observaram quantidades equimolares de FB_1 e de HFB_1 neste tipo de pão especial. Os níveis de contaminação encontrados em amostras de *tortillas* são inferiores aos encontrados em amostras portuguesas de broa.

No que concerne à *polenta*, Doko e Visconti (1994) analisaram *polenta* caseira de Itália e concluíram que esta se encontrava contaminada com 2880 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_1 e 620 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de FB_2 . Os mesmos autores também analisaram os níveis de contaminação de farinha de milho usada especificamente na produção de *polenta* e observaram que a FB_1 e a FB_2 estavam presentes num intervalo de 420 a 3730 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 80 a 840 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. No Reino Unido, o total de FBs encontrado em *polenta* variou entre 16 e 2124 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Patel *et al.*, 1997). Na Alemanha, a FB_1 foi observada num intervalo de 46 a 1230 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em *polenta* (Usleber *et al.*, 1994), enquanto que na Holanda a FB_1 foi encontrada em níveis inferiores a 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (De Nijs *et al.*, 1998).

Os níveis de contaminação encontrados em *polenta* são habitualmente mais elevados relativamente aos encontrados em amostras de broa portuguesa. Contrariamente, os níveis encontrados em *tortillas* são habitualmente inferiores. Os

processos de cocção de cada matriz explicam este facto. No processamento de *polenta* a farinha de milho é fervida, no entanto, apesar de as FBs serem solúveis em água, possivelmente a temperatura atingida é ineficiente na redução da presença das referidas micotoxinas. Contrariamente, o processamento de *tortillas* envolve nixtamalização, que reduz eficientemente o seu conteúdo.

O processamento da broa implica apenas dois procedimentos fundamentais, fermentação e cozedura. No que respeita à fermentação, em 2005, Fandohan *et al.* estudaram o destino das FBs durante o processamento de milho em produtos alimentares de Benin e concluíram que este processo, aparentemente, não apresenta um impacto significativo nos níveis de micotoxinas dos produtos considerados para este estudo. Observaram apenas 13% de redução nos níveis de FBs aquando da fermentação de *ogi*, um valor considerado insignificante. O aumento do tempo de fermentação de 24 para 72 horas não afectou significativamente os níveis de micotoxinas nos referidos produtos. A redução de FB₁ por bactérias do ácido láctico em *meal* (papa) de milho fermentado foi estudada por Mokoena *et al.* (2005). Uma papa de milho foi fortificada com FB₁, deixando-se fermentar durante 4 dias. Neste caso, os resultados obtidos indicam que a fermentação por bactérias do ácido láctico podem reduzir significativamente a concentração destas micotoxinas em milho. Após fermentação, as amostras de *meal* de milho fortificadas contendo bactérias do ácido láctico apresentavam-se menos tóxicas para a linha celular SNO do EC humano comparativamente às amostras sem bactérias do ácido láctico. No entanto, esta redução pode não alterar significativamente os possíveis efeitos tóxicos destas toxinas. No Nepal, milho e outros grãos são fermentados para produzir cervejas tradicionais a partir de milho e trigo. Para determinar os efeitos da fermentação na contaminação por FBs foi confeccionado milho experimentalmente contaminado inoculando-o com uma cultura *starter* Nepalesa. Após 5 dias de fermentação, o nível de FB₁ não apresentou alterações (Desjardins *et al.*, 2000).

Jackson *et al.* (1996 a; b) estudaram o efeito do pH, tempo e temperatura na estabilidade da FB₁ e FB₂ e concluíram que parâmetros físicos como o tempo de processamento e temperaturas elevadas são factores críticos que afectam a

sua decomposição. Também concluíram que estas micotoxinas são consideravelmente estáveis, sobretudo a pH neutro e que, geralmente, as suas perdas são mais rápidas e extensas em condições alcalinas ou ácidas. Estes resultados sugerem que quando os alimentos são sujeitos a temperaturas entre 100 e 125°C, atingidas aquando do processamento de alimentos fervidos ou *retorted*, é expectável uma pequena alteração no conteúdo de FBs. Alimentos que sejam sujeitos a temperaturas superiores a 150°C aquando do seu processamento, como os que vão ao forno ou sujeitos a fritura podem apresentar perdas substanciais de FBs (Jackson *et al.*, 1996 a; b; Soriano e Dragacci, 2004). Por outro lado, com estudos distintos foi possível observar que sob condições normais de fritura e cozedura em forno, incluindo a produção de pão, as perdas de FB₁ são pequenas, produzindo efeitos pouco significativos no conteúdo de FBs (Jackson *et al.*, 1997; Saunders *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos na análise de broa estão de acordo e podem ser explicados pelos estudos acima referidos.

III.4.2.3. INGESTÃO DIÁRIA ESTIMADA

Um dos aspectos mais importantes na avaliação do risco de substâncias químicas é a determinação do grau de exposição do organismo humano. Considerando os resultados obtidos neste estudo, para todas as amostras adquiridas na zona Centro de Portugal, a média de contaminação para a FB₁ foi 110 µg kg⁻¹, e para o total FB₁+FB₂ foi 140 µg kg⁻¹. Por outro lado, de acordo com dados da Balança Alimentar Portuguesa, o consumo de milho atingiu, em 2003, 10,19 kg por pessoa por ano, o que significa 27,90 g por pessoa por dia, segundo lugar no ranking da UE para o consumo total de cereais (INE, 2004). Assumindo este facto e, também, que o peso corporal (p.c.) de um adulto é em média 60 kg, a ingestão diária estimada (EDI) da população portuguesa neste estudo, para a FB₁ e para a FB₁+FB₂, foi de 51 e 65 ng kg⁻¹ p.c./dia, respectivamente, o que corresponde a 26 e 33%, respectivamente, da ingestão diária estimada total da FB₁ da dieta europeia, 200 ng kg⁻¹ p.c./dia (Soriano e Dragacci, 2004).

A TDI, o consumo e as EDIs calculadas com base no nível médio de FB₁ e FB₁+FB₂ encontrado nas diferentes matrizes analisadas apresentam-se na Tabela III.16 e na Figura III.14. As EDIs são muito inferiores à TDI estabelecida pela Comissão Europeia (EC N.º 856/2005).

Tabela III.16 Ingestões diárias estimadas (EDIs)¹ de FBs encontradas nas diferentes matrizes estudadas em Portugal.

Alimentos	TDI ² (µg kg ⁻¹ p.c./dia)	Consumo (g pessoa ⁻¹ /dia)	Ingestão diária estimada (EDI) para FB ₁ (ng kg ⁻¹ p.c./dia)	% EDI relacionada com a TDI da dieta europeia	% EDI relacionada com a ETI da dieta europeia	EDI para FB ₁ +FB ₂ (ng kg ⁻¹ p.c./dia)
Milho	2	27,9	153	7,65	76,5	214
Farinha de milho	2	25,9 ³	356	17,8	178	431
Sémola de milho	2	1,36 ⁴	2,7	0,135	1,35	2,7
Milho doce	2	15,83 ⁵	16,9	0,8	8,4	16,9
Snacks de milho	2	1,99	0,34	0,017	0,17	0,52

¹ EDI calculada usando a equação $EDI = (\Sigma c) (CN^{-1}D^{-1}K^{-1})$, onde Σc é a soma da concentração de FBs presentes nas amostras analisadas (µg kg⁻¹), C é o consumo médio anual por pessoa, N é o número total de amostras analisadas, D é o número de dias num ano, e K é o peso corporal médio, neste caso foi considerado 60 kg.

² TDI proposta pela Comissão Europeia (2005).

³ Dados Europeus de Directorate-General Health and Consumer Protection, Abril 2003 (dados relativos aos consumidores de Itália).

⁴ Dados Europeus de Directorate-General Health and Consumer Protection, Abril 2003 (médias das populações de França e Itália).

⁵ Dados Europeus de Directorate-General Health and Consumer Protection, Abril 2003 (médias das populações da Alemanha).

A ingestão diária tolerável (TDI) para a FB₁+FB₂ é 2 µg kg⁻¹ p.c./dia (EC N.º856/2005). Este valor não foi ultrapassado pela amostra mais contaminada, que representa 47% da TDI estabelecida pela Comissão Europeia (N.º856/2005). A farinha de milho apresentou a maior contribuição para a ingestão da FB₁, sendo a percentagem da ingestão diária estimada (EDI) relativamente à ingestão total estimada (ETI) dos dados europeus de 178% (Tabela III.16).

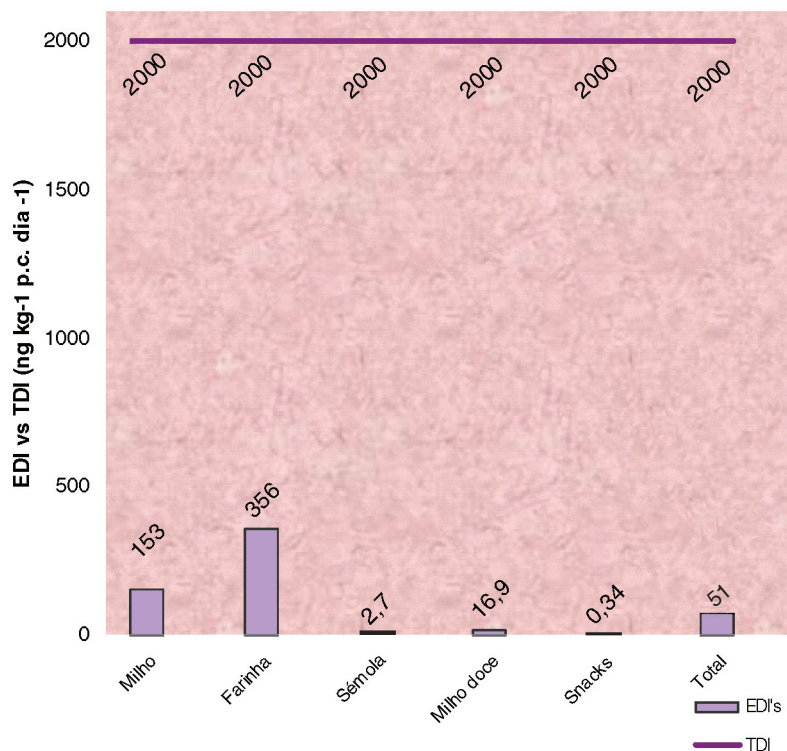


Figura III.14 EDI para a FB₁ versus TDI nas diversas matrizes de milho e derivados estudadas em Portugal.

De acordo com os resultados obtidos, a contaminação média, para todas as amostras adquiridas em Valência, para a FB₁ foi 57 µg kg⁻¹, e para o total FB₁+FB₂ foi 98 µg kg⁻¹. De acordo com dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), o consumo de milho em Espanha atingiu, em 2005, 12,77 g por pessoa por dia (<http://faostat.fao.org/site/33a/default.aspx>). Assumindo este facto e que o peso corporal de um adulto é em média 60 kg, a ingestão diária estimada (EDI) da população espanhola neste estudo, para a FB₁ e para a FB₁+FB₂, foi de 12 e 21 ng kg⁻¹ p.c./dia, respectivamente, o que corresponde a 6 e 11%, respectivamente, da ingestão diária estimada total da FB₁ da dieta europeia, 200 ng kg⁻¹ p.c./dia (Soriano e Dragacci, 2004).

A TDI, o consumo e as EDIs calculadas com base no nível médio de FB₁ e FB₁+FB₂ encontrado nas diferentes matrizes analisadas apresentam-se na Tabela III.17. As EDIs são muito inferiores à TDI estabelecida pela Comissão Europeia (N.º 856/2005).

A ingestão diária tolerável (TDI) para a FB₁+FB₂ é 2 µg kg⁻¹ p.c./dia (EC N.º856/2005). Este valor não foi ultrapassado pela amostra mais contaminada, que representa 34% (676 ng kg⁻¹ p.c./dia) da TDI estabelecida pela Comissão Europeia (EC N.º 856/2005). A farinha de milho apresentou a maior contribuição para a ingestão da FB₁, sendo a percentagem da ingestão diária estimada (EDI) relativamente à ingestão total estimada (ETI) dos dados europeus de 54,5% (Tabela III.17).

Tabela III.17 Ingestões diárias estimadas (EDIs)¹ de FBs encontradas nas diferentes matrizes estudadas em Espanha.

Alimentos	TDI ² (µg kg ⁻¹ pc dia ⁻¹)	Consumo (g pessoa ⁻¹ dia ⁻¹)	Ingestão diária estimada (EDI) para FB ₁ (ng kg ⁻¹ pc dia ⁻¹)	% EDI relacionada com a TDI da dieta europeia	% EDI relacionada com a ETI da dieta europeia	EDI para FB ₁ +FB ₂ (ng kg ⁻¹ pc dia ⁻¹)
Farinha de milho	2	25,9 ³	109	5,45	54,5	190
Snacks de milho	2	8,4 ⁴	9,8	0,49	4,9	9,8
Outros	2	11,5 ⁵	13,61	0,68	6,8	21,66

¹ EDI calculada usando a equação $EDI = (\sum c) (CN^{-1}D^{-1}K^{-1})$, onde $\sum c$ é a soma da concentração de FBs presentes nas amostras analisadas (µg kg⁻¹), C é o consumo médio anual por pessoa, N é o número total de amostras analisadas, D é o número de dias num ano, e K é o peso corporal médio, neste caso foi considerado 60 kg.

² TDI proposta pela Comissão Europeia (2005).

³ Dados Europeus de Directorate-General Health and Consumer Protection, Abril 2003 (dados relativos aos consumidores de Itália).

⁴ Dados Europeus de Directorate-General Health and Consumer Protection, Abril 2003 (médias das populações da Alemanha e da Bélgica).

⁵ Dados Europeus de Directorate-General Health and Consumer Protection, Abril 2003 (dados relativos à população italiana).

A contaminação média das amostras de broa adquiridas na zona Centro de Portugal para o total de FB₁ + FB₂ foi 274 µg kg⁻¹. Assumindo que o consumo diário estimado de pão em 1994 para a população portuguesa foi 32 kg por pessoa por ano (Instituto Português do Consumidor, 2005) e considerando que o consumo de broa representa um quarto do consumo total de pão, o consumo de broa foi, em 1994, 21,9 g por pessoa por dia. Assim, a ingestão diária estimada (EDI) para ambas as micotoxinas para um adulto com peso corporal de 60 kg foi, em média, 0,10 µg kg⁻¹ p.c./dia ou 0,70 µg kg⁻¹ p.c./semana.

Relativamente à FB_1 , a ingestão foi, em média, $0,072 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ p.c./dia}$ ou $0,504 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ p.c./semana}$, um valor distante (36%) da ingestão estimada total da FB_1 na dieta europeia, $1,4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ p.c./semana}$ (Soriano e Dragacci, 2004).

A ingestão diária tolerável (TDI) proposta pela Comissão Europeia para o total de FB_1+FB_2 é $2 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ p.c./dia}$. Este valor não foi excedido por nenhuma das amostras contaminadas, representando 5% da TDI.

III.5. CONCLUSÕES

A extracção com metanol:água, centrifugação e diluição com PBS permitiram a purificação do sobrenadante pela coluna IAC, possibilitando a análise simultânea e rápida e detecção e quantificação sensíveis da FB_1 e FB_2 .

No que concerne à metodologia analítica aplicada com LC-FD, a estabilidade dos derivados fluorescentes do NDA permitiram ultrapassar o facto do OPA apresentar degradação dependente do tempo. A metodologia otimizada permite resultados satisfatórios no que respeita a exactidão, precisão e sensibilidade, e mostrou ser adequada para a determinação de FB_1 e FB_2 em milho, produtos derivados de milho, e também na broa, apresentando limites de detecção de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB_1 e FB_2 , respectivamente.

Os resultados obtidos por LC-FD foram confirmados por LC-MS, tendo-se também procedido à análise de amostras adquiridas em Valência por LC-MS-MS. Um estudo comparativo dos três detectores de cromatografia líquida – FD, quadrupolo simples e quadrupolo triplo (QqQ) – na análise de amostras de milho e derivados foi efectuado, permitindo concluir de que a resposta conseguida pelos três detectores é suficientemente sensível de acordo com os limites estabelecidos pela legislação europeia. Todos os detectores usados são apropriados para a quantificação das micotoxinas em estudo, no entanto, a aquisição de pelo menos duas transições conseguida com QqQ permite uma identificação inequívoca e unívoca.

A aplicação deste procedimento à análise de 67 amostras adquiridas na zona Centro de Portugal demonstrou que 22,4% das amostras se encontravam

contaminadas. Os níveis de contaminação de FB₁ foram superiores aos de FB₂. As FBs não foram detectadas em amostras de amido de milho, cornflakes e cereais mistos. Todas as outras matrizes apresentaram-se positivas para o total de FB₁+FB₂, com níveis de contaminação médios que oscilaram entre 16 e 995 µg kg⁻¹. Apenas uma amostra excedeu o limite estabelecido pela Comissão Europeia.

No que respeita às matrizes adquiridas em Valência durante 2006, verificou-se que a ocorrência e os níveis de contaminação de FB₁ e FB₂ foram inferiores nas matrizes não-orgânicas, tendo uma amostra de farinha de milho excedido os limites em vigor. Para uma avaliação mais completa da qualidade de alimentos orgânicos e convencionais é necessário o estudo de um maior número de amostras.

Relativamente à matriz broa, 83% das amostras encontravam-se contaminadas. De igual modo, a contaminação de FB₁ foi superior à de FB₂. Os limites fixados pela Comissão Europeia em 2006 foram excedidos por 27% das amostras. Nenhuma amostra excedeu a actual legislação.

Nenhuma das amostras analisadas excedeu a TDI estabelecida pela Comissão Europeia pelo que, aparentemente, a contaminação de FBs não produz risco para a população portuguesa e espanhola. No entanto, algumas amostras apresentaram níveis de contaminação preocupantes. Consequentemente, esforços adicionais são necessários para prevenir a contaminação de milho e produtos derivados por espécies de *Fusarium* e subsequente produção de FBs, com o objectivo de minimizar a exposição humana.

CAPÍTULO IV – DETERMINATION OF FUMONISINS B₁ AND B₂ IN HUMAN URINE

- IV.1. Introduction
- IV.2. Sampling
- IV.3. Materials and methods
 - IV.3.1. Chemical reagents and standard solutions
 - IV.3.2. Materials and equipment
 - IV.3.3. Recovery assays
 - IV.3.4. Extraction and clean-up
 - IV.3.5. Liquid chromatography with fluorescence detection: precolumn derivatisation
 - IV.3.6. Liquid chromatography with fluorescence detection: postcolumn derivatisation
 - IV.3.7. Liquid chromatography with mass-mass detection
- IV.4. Results and discussion
 - IV.4.1. Extraction and clean-up
 - IV.4.2. Liquid chromatography with fluorescence detection: precolumn derivatisation
 - IV.4.3. Liquid chromatography with fluorescence detection: postcolumn derivatisation
 - IV.4.4. Liquid chromatography with mass-mass detection
- IV.5. Conclusions

IV.1. INTRODUCTION

Fumonisin (FBs), fungal toxins mainly produced by *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) and *F. proliferatum*, contaminate maize and maize-based foods throughout the world (Shephard *et al.*, 1996a). Of the FBs currently identified, fumonisin B₁ (FB₁), followed by fumonisin B₂ (FB₂), is the most abundant and toxic (Labuda *et al.*, 2003).

Due to their structural similarity with sphinganine (Sa) and sphingosine (So), intermediate compounds in the sphingolipid metabolism, FBs inhibit ceramide synthase and block the biosynthesis of complex sphingolipids leading to a wide spectrum of effects in animals and humans, including cytotoxicity and carcinogenicity (Wang *et al.*, 1991). The epidemiological association to human esophageal cancer (EC) in some regions of South Africa and China (Lerda *et al.*, 2005), and the possible connection with neural tube defects (NTD) in South Texas, USA (Stack, 1998) have been reported. The International Agency for Research on Cancer (IARC) classified FB₁ as a possibly carcinogen to humans, Group 2B (IARC, 2002).

In view of FBs pathological effects, the development of analytical methodology to better assess human exposure through the use of biomarkers is of great importance (Prelusky *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1999; Chelule *et al.*, 2000). Ideally biomarkers should be specific, sensitive and not too invasive for human studies (Crews *et al.*, 2001).

FB₁ does not appear to undergo any major metabolism, as incubation with primary rat hepatocyte cultures and subcellular enzyme fractions failed to produce detectable metabolites. Furthermore, FB₁ has been recovered unaltered in the urine and bile of dosed animals. Although some hydrolysis products, mostly partially hydrolysed FB₁ (PHFB₁), occur in the gut of vervet monkeys, these do

not provide metabolic products that would be useful as biomarkers. Given the absence of measurable metabolites, FB₁ itself has been suggested as a biomarker and analytical methods for its determination in a range of physiological samples have been developed (Shephard *et al.*, 2007).

FB₁ determination in biological rat fluids, plasma and urine, with liquid chromatography with fluorescence detection has been reported (Shephard *et al.*, 1992a) two years after its analysis in maize from the Transkei region, South Africa, where a high incidence of EC was observed (Sydenham *et al.*, 1990). Later, FB₂ was also determined in physiological rat samples (Shephard *et al.*, 1995a).

Based on an allometric relationship between animal weight and the toxicokinetically determined terminal half-life following FB₁ administration, it has been estimated that the half-life in a 70 kg human is 128 min (Delongchamp and Young, 2001). The estimation of free FBs in plasma is impractical due to its poor absorption and rapid excretion, leading to low plasma levels (Chelule *et al.*, 2000).

Few studies have been published concerning the presence of FBs in human biological samples. The matrixes that have been studied were urine (Shetty and Bhat, 1998), faeces (Chelule *et al.*, 2000), and hair (Sewram *et al.*, 2003).

Toxicokinetic studies with labelled and unlabelled FBs have shown that a fraction of the quantity ingested is excreted in urine (Shephard *et al.*, 1994; 1995b), and hence urine can act as a better indicator for monitoring the exposure of human populations to FBs (Shetty and Bhat, 1998).

The analytical methodology used for the determination of FBs in urine samples is usually based on an extraction with mixtures of polar solvents, water and methanol, followed by clean-up procedures with solid phase extraction (SPE) such as strong-anion exchange cartridges (SAX) (Shephard *et al.*, 1992a; 1995a; b; Shephard and Snijman, 1999), and Amberlite XAD-2 polymeric adsorbent resin prior to SAX clean-up (Shetty and Bhat, 1998). As far as we know, the use of immunoaffinity columns (IAC) has never been reported although they present higher specificity.

FBs lack an UV chromophore and they must be derivatized for fluorescence detection on the free amine group (Plattner, 1999) for detection and quantification with liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FD) (Shephard *et al.*, 1992a; 1995 a; b; Shetty and Bhat, 1998; Shephard and Snijman, 1999).

Various precolumn derivatisation techniques have been reported (Sama-pundo *et al.*, 2006). Orto-phthalaldehyde (OPA) together with 2-mercaptoethanol (MCE) (Figure IV.1) is the most used derivatisation reagent in the determination of FBs in biological samples, including urine, with precolumn derivatisation (Shephard *et al.*, 1992a; 1995a; b; Shetty and Bhat, 1998; Shephard and Snijman, 1999; Chelule *et al.*, 2000). Although the reaction is easy to perform, within a short reaction time of a few minutes, producing a highly fluorescent derivative, the major disadvantage of methods based on OPA precolumn derivatisation is the instability of the derivative formed. Therefore, the derivatisation must be performed under rigorous time controlled conditions to get reproducible data, however it is difficult to perform more than one chromatographic injection (Akiyama *et al.*, 1998; Stroka *et al.*, 2002; Paepens *et al.*, 2005).

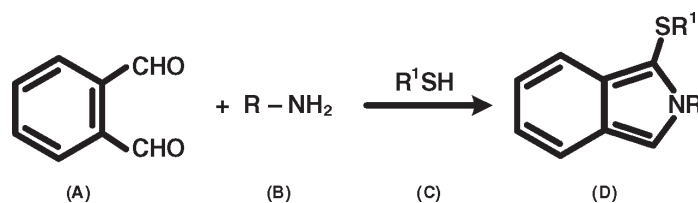


Figure IV.1 Schematic diagram of precolumn derivatisation reaction with OPA-MCE: (A) OPA; (B) FBs; (C) MCE; (D) fluorescent derivative.

Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) precolumn derivatisation (Figure IV.2) is the choice of some authors in food and biomarkers analysis (Cho *et al.*, 2002; Lombaert *et al.*, 2003; Lino *et al.*, 2006). Although the derivatisation procedure requires a rather long reaction time (15 min), high temperature (60°C), and an extremely toxic reagent (potassium cyanide) (Bennet and Richard, 1994, Miyahara *et al.*, 1996; Lino *et al.*, 2006), the derivatives produced present higher stability (Scott and Lawrence, 1995; Lino *et al.*, 2006).

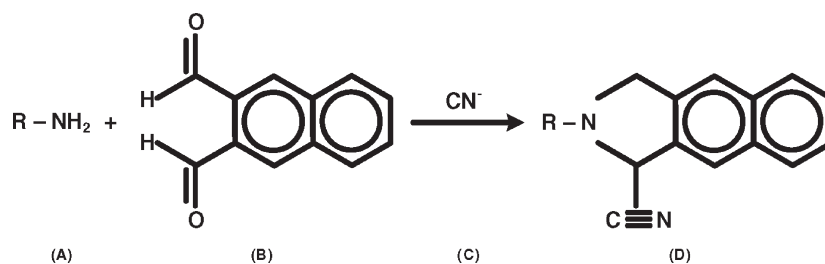


Figure IV.2 Schematic diagram of precolumn derivatisation reaction with NDA-KCN: (A) fumonisin; (B) NDA; (C) cyanide ion; (D) fluorescent derivative.

For amine analysis using OPA, several reactants other than MCE, such as *N*-acetyl-cystein (NAC) have been described to be superior in terms of stability and intensity of the fluorescent derivatives (Zuman, 2005).

Precolumn derivatisation may be seen as less demanding in what respects to the equipment needed since analyte conversion is completed before chromatographic separation is initiated. However, this potential benefit is often gained at the expense of complex and time-consuming sample preparation. Moreover, since the derivatisation process is administered to all analytes simultaneously, there is the possibility that conversion will not be uniform and that the relative concentration of analyte derivatives will differ from their precursors in the untreated sample. If these were to occur, it could be problematic for quantification (<http://www.touchbriefings.com/pdf/1133/pickering.pdf>).

Postcolumn derivatisation, by contrast, derivatises each analyte in isolation, after chromatographic separation, under an excess of the derivatisation reagent, and the conversion is uniform across the suite of analytes. While it is true that postcolumn derivatisation conditions must be carefully configured and controlled so as to allow derivatives formation and maintain chromatographic resolution, sample preparation is relatively simple compared with precolumn methods, and the in-line nature of the process also facilitates automation (<http://www.touchbriefings.com/pdf/1133/pickering.pdf>).

For routine determination of samples, a simple, safe, and rapid automated derivatisation procedure is required. Postcolumn derivatisation is a procedure frequently applied in aminoacids, amphetamines (Herráez-Hernandez and Campíns-

-Falcó, 2000), and biotin (Nojiri *et al.*, 1998) determination, since it facilitates analysis automation (Herráez-Hernandez and Campíns-Falcó, 2000), and because the derivative is formed postcolumn, the chromatographic separation is preserved. OPA postcolumn derivatisation (Figure IV.3) was only applied in two studies on the determination of FBs in foods (Miyahara *et al.*, 1996; Akiyama *et al.*, 1998), and was never applied in the determination of FBs in biological samples.

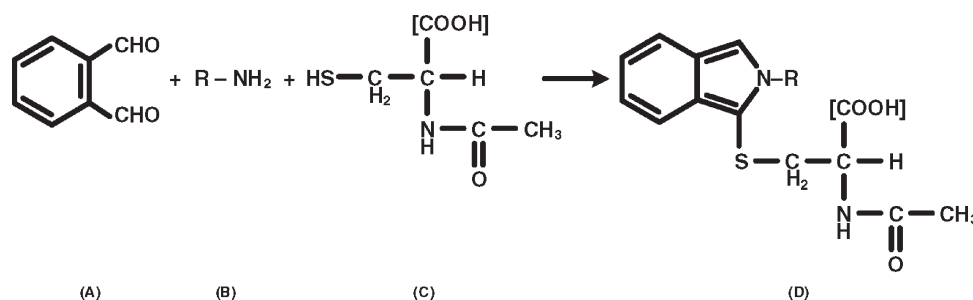


Figure IV.3 Schematic diagram of postcolumn derivatisation reaction with OPA-NAC: (A) OPA; (B) fumonisin; (C) NAC; (D) fluorescent derivative.

In order to avoid the derivatisation process, and the disadvantages implicated and previously referred, mass detection is an analytical methodology of great use, widely applied to the analysis of FBs in food, but which was not fully applied in the determination of these mycotoxins in human biological samples. Only two studies used this technique in the analysis of hair (Sewram *et al.*, 2001; 2003).

In the present study the possibility of performing the analysis of FB₁ and FB₂ in human urine using IAC for clean-up, and quantification by precolumn derivatisation with NDA and postcolumn derivatisation with OPA, following LC with spectrofluorimetric detection was evaluated. The critical discussion and comparing of both derivatisation procedures in terms of their instrumental requirements, chromatographic separation, derivatisation efficiency, sensitivity, and reproducibility were discussed.

The present study also aimed to provide data on natural occurrence of FB₁ and FB₂ in human urine samples obtained from two populations, one urban and one rural, from the central zone of Portugal, using LC-ESI-MS-MS, after sample dilution with PBS and SPE extraction through IAC.

IV.2. SAMPLING

The collection of human urine was according to the Declaration of Helsinki and it was based in the evaluation of FB₁ and FB₂ concentration in the urine of different groups of populations. This research project did not involve any human risks for the participating subjects, since no ingestion or administration was given to the subjects. Each individual involved in the study also gave a signed authorization allowing the collection of urine for this study. The subjects were volunteers, and were asked to complete a rapid questionnaire about age, weight, and height.

The present study was carried out in 2007 in the central zone of Portugal, in Coimbra, the most important city of this region, and its neighbourhood. Samples were collected in Coimbra city and one farming village, Pereira, which is located in the Mondego valley, in the left bank of the river, about 15 km from Coimbra. A total of 68 morning-urine samples were collected from male and female adult healthy volunteers from the rural population of Pereira, and the urban population from Coimbra, from February to March 2007. From the 30 rural samples, 14 were from males and 16 from females, aging between 16 and 81 years old (49.8 ± 16.6), with mean heights and mean weights of 1.65 ± 0.1 and 69.8 ± 9.7 , respectively. From the 38 urban samples, 19 were from males and 19 from females, aging between 20 and 82 years old (39.4 ± 16.0). Mean heights and mean weights were 1.7 ± 0.1 , and 69.0 ± 11.7 , respectively. Samples were collected in sterile urine beakers and stored at -20°C until analysis.

IV.3. MATERIALS AND METHODS

IV.3.1. CHEMICAL REAGENTS AND STANDARD SOLUTIONS

FB₁ and FB₂ standards, NDA, decanesulfonic acid, and N-acetyl-cysteine (NAC) were commercially obtained from Sigma Chemicals Co (St. Louis, USA). HPLC grade acetonitrile and methanol were purchased from Carlo Erba

(Milan, Italy). Acetic acid, hydrochloride acid, sodium hydroxide, potassium chloride, potassium dihydrogen phosphate, anhydrous disodium hydrogen phosphate, sodium hydrogen carbonate, potassium cyanide, sodium borate, trichloroacetic acid, triethylamine, sodium carbonate, boric acid, potassium sulfate, sodium sulfite, sodium lauryl sulfate and sodium chloride were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). OPA and phosphoric acid were obtained from Carlo Erba (Milan, Italy). Formic acid was from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). The water used was bi-distilled.

Phosphate buffer solution (PBS) was prepared as in the analysis of foods, described in Sub-chapter III.3. Therefore, 0.2 g potassium chloride, 0.2 g potassium dihydrogen-phosphate, 1.2 g anhydrous disodium hydrogen phosphate, and 8.0 g sodium chloride were added to 990 mL distilled water, adjusted to pH 7.0 with 25% HCl, and the solution was made to 1 L.

For precolumn derivatisation, the NDA reagent was prepared at 0.5 mg mL⁻¹ in acetonitrile. The sodium cyanide solution was at 0.13 mg mL⁻¹, and a 0.05 M sodium borate buffer was adjusted with 1 N NaOH at pH 9.5.

The reagent solution for postcolumn derivatisation consisted of 800 mg of OPA and 1 g of NAC in 1 L of the reaction buffer (0.384 M sodium borate, 0.216 M boric acid, and 0.108 M potassium sulphate).

The phosphate buffer used in the preparation of the mobile phase for LC-FD with postcolumn derivatisation consisted of 0.5 mM potassium dihydrogen phosphate, phosphoric acid, and 1 mM sodium lauryl sulphate.

All the standard solutions were prepared in acetonitrile:water (50:50), kept in amber flasks at 4°C, and frozen when not in use. Stock solutions of FB₁ and FB₂ were made at 1000 µg mL⁻¹, and intermediate solutions at 50 µg mL⁻¹. For fortification assays, two work solutions were prepared at 5 and 1 µg mL⁻¹ for both FBs, and for linearity evaluation the standards were prepared in the range of 0.05 to 10 µg mL⁻¹.

IV.3.2. MATERIALS AND EQUIPMENT

In this study the following material and equipment was used:

- immunoaffinity columns FumoniTest™ were from Vicam (Watertown, USA);
- filter paper Whatman N.º 541;
- vacuum manifold;
- centrifuge Meditronic S-599 (Selecta, Barcelona, Spain);
- vortex mixer Retsh (Haan, Germany);
- heating bath;
- Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA);
- membrane filter 0.45 µm pore size
- ultrasonic bath Sonorex RK 100 (Berlin, Germany).

The liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FD) equipment was similar to that used in the analysis of maize and maize-based foods (Sub-chapter III.3.2) and consisted of:

- pump model Gilson 307 (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France);
- injector Rheodyne 7125 (Cotati, CA, USA);
- pre-filter;
- analytical column C₁₈ – 5 µm Nucleosil 120 (250 mm x 4,6 mm i.d.);
- spectrofluorimeter Perkin Elmer LS45 (Perkin Elmer, Beaconsfield, UK);
- integrator 3390 (Hewlett Packard Philadelphia, PA).

For postcolumn derivatisation (Figure IV.4) the following equipment was also used:

- pump model 305 Gilson (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France);
- stainless tube coil (0.25 mm i.d. x 5m);
- thermostatically regulated bath.

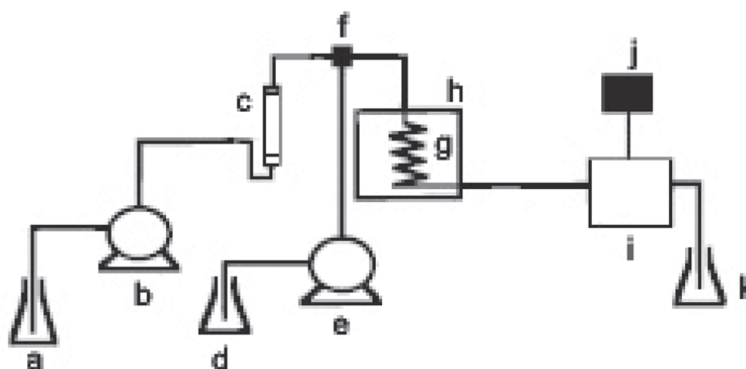


Figure IV.4 Schematic diagram of the LC system with postcolumn derivatisation: a) mobile phase; b) pump 1; c) analytical column d) reaction solution OPA-NAC; e) pump 2; f) reaction box; g) reaction coil; h) thermostatic bath i) spectrofluorimeter; j) integrator; k) waste.

The liquid chromatography with mass-mass detection (LC-ESI-MS-MS) equipment, Waters 2695 (Milford, MA, USA), was also similar to that used in the analysis of maize and maize-based foods (Sub-chapter III.3.2) and consisted of:

- 4 channels pump;
- auto-injector;
- guard-column C₁₈ (4 cm×2 mm i.d.), Phenomenex (Madrid, Spain);
- analytical column Luna C₁₈ column 5 μm (150 mm×4.6 mm i.d.), Phenomenex (Madrid, Spain);
- mass detector TQ Quattro LC from Micromass (Manchester, U.K.), equipped with a pneumatically assisted electrospray probe and a Z-spray interface;
- Mass Lynx NT 4.1 software for data acquisition and processing.

IV.3.3. RECOVERY ASSAYS

Recoveries of FBs from human urine were determined by spiking a blank sample, for three replications, with known amounts of FB₁ and FB₂ at final levels of of 100, 50, and 10 ng mL⁻¹, for both FBs (Table IV.1).

IV.3.4. EXTRACTION AND CLEAN-UP

An aliquot of human urine sample was filtered through a filter paper. Afterwards, 10 mL were diluted with equal volume of PBS and thoroughly mixed for 3 min with a vortex mixer. For clean-up, the mixture was loaded on the IAC attached onto a vacuum manifold with a flow rate of about 1 drop/s. The column was washed with 10 mL PBS, and FBs were then slowly eluted with 5 mL methanol into a glass vial, until air pass through the column to collect the last drops of eluate. The eluted sample was evaporated to dryness under one gentle nitrogen stream at 60°C.

IV.3.5. LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION: PRECOLUMN DERIVATISATION

For LC-FD with precolumn derivatisation analysis, the residue was reconstituted in 50 µL methanol:water (50:50, v/v) and determination and quantification were carried out on the NDA-derivatives of FBs. Therefore, 500 µL sodium borate buffer, 500 µL sodium cyanide reagent, and 150 µL NDA reagent were added to the reconstituted residue. The mixture was heated for 15 min at 60°C in a heating bath and cooled to room temperature.

The mobile phase that consisted of a mixture of acetonitrile:water:acetic acid (61:38:1, v/v/v), after filtration and degasification, was maintained at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The above mentioned derivatives presented maximum fluorescence at excitation wavelength of 420 nm, and emission wavelength of 500 nm.

IV.3.6. LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION: POSTCOLUMN DERIVATISATION

For LC-FD with postcolumn derivatisation analysis, the residue was reconstituted in 150 µL methanol:water (50:50, v/v) and determination and quantification were carried out on the OPA-derivatives of FBs accordingly to Miyahara

et al. (1996) (Figure IV.4). The derivatizing reagent was mixed with the eluate from the analytical column at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The mixture was then passed through a stainless tube coil in a dry reaction thermostatically regulated bath at 40°C. The mobile phase consisted of a mixture of pH 2.5 phosphate buffer and acetonitrile (1:1), and after filtration and degasification, was maintained at a flow of 1 mL min⁻¹. The effluent was spectrofluorimetrically monitored with an excitation and emission wavelengths of 336 and 460 nm, respectively.

IV.3.7. LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH MASS-MASS DETECTION

LC-ESI-MS-MS analysis of FB₁ and FB₂ in urine was done accordingly to the method optimized for the analysis of maize and maize-based foods, described in Sub-chapter III.3.8. Briefly, it was performed after reconstituting the residue to 1 mL methanol:water (50:50, v/v). LC analysis was carried out after the injection of 20 µL. The analytical separation was performed at 30°C using gradient elution with water as mobile phase A, and methanol as mobile phase B, both containing 0.5% formic acid. After an isocratic step of 65% B for 3 min, it was linearly increased to 75% B in 4 min and held constantly for 8 min. Afterwards the initial conditions were maintained for 10 min. Flow rate was maintained at 0.3 mL min⁻¹.

The TQ mass spectrometer was used in positive ion mode. The ESI source values were as follows: capillary voltage, 3.20 kV; extractor, source temperature, 125°C; desolvation temperature, 300°C; desolvation gas (nitrogen, 99.99% purity) flow, 500 L/h.

The cone voltage used was 50 V. As for the collision energy, it was 40 eV for FB₁ and 35 eV for FB₂.

For the detection of FB₁ the precursor ion was *m/z* 722, being the product ions selected *m/z* 352, and 334. For FB₂, the precursor ion was *m/z* 706, and the product ions *m/z* 318 and 336. The above described conditions allowed the elution of FB₁ and FB₂ with a retention time of about 7.5 min and 13.85 min, respectively (Figure IV.8).

IV.4. RESULTS AND DISCUSSION

IV.4.1. EXTRACTION AND CLEAN-UP

Urine contains high concentrations of solutes that interfere with SAX cartridges clean-up (Shephard *et al.*, 1992a), the procedure mostly reported (Shephard *et al.*, 1992a; 1995a; b; Shephard and Snijman, 1999; Chelule *et al.*, 2000). Consequently, small volumes of rat urine must be diluted several fold before clean-up with these cartridges to get acceptable recovery and reproducibility (Shephard *et al.*, 1992a).

Shetty and Bhat (1998) state that this method cannot be used in human urine, probably based on the low FBs content in human, compared to rat urine and due to the many interferents present. Although the inclusion of the pre-SAX Amberlit XAD-2 polymeric adsorbent resin clean-up successfully removes the interfering compounds (Shetty and Bhat, 1998), this procedure is labour and time consuming.

Therefore, in order to develop a simpler and specific clean-up procedure immunoaffinity columns were applied for the first time in the analysis of FBs in human urine.

Initially, an aliquot of 10 mL was diluted with equal volume of 5% sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) and, after mixing and filtration, 10 mL were added to the IAC column, which was then washed twice with 5 mL of water. FBs were eluted with 3 mL of methanol, and quantified by LC-FD with precolumn derivatisation. This procedure proved to be inadequate since many interferents were present in the sample, mainly in the retention time of FB_1 .

In order to minimize these interferents, the volumes of urine and NaHCO_3 were half reduced, and the IAC washed twice with 5 mL of PBS. FB_2 results were improved; however FB_1 maintained a deficient chromatographic separation from matrix interferents.

Attempts were made to optimize the analytical methodology, and consequently, prior to sample clean-up, a deproteinization step with trichloroacetic

acid (TCA) (Carreira *et al.*, 2003) was included in order to minimize eventual urine proteins or components possessing amines, that could interfere with FBs determination, particularly in precolumn derivatisation. Therefore, TCA (10% m/v) was added, and after vigorous mixing and centrifugation, for 10 min at 1800 g, 5 mL of the upper phase were diluted with 5 mL of PBS, following filtration, and IAC clean-up. However, this deproteinization step did not improve the results, and so it was not included in the method.

Our findings showed that this extraction and clean-up procedure together with precolumn derivatisation did not allow the separation of FB₁ from impurities. To overcome this problem, postcolumn derivatisation was successfully evaluated in the analysis of urine extracts, since good clean blank extracts were obtained.

Consequently, to optimize recovery efficiency, the volumes of the eluent solvent were studied. The results showed that 3 mL of methanol were insufficient to elute all the FBs from the IAC. Therefore, a second elution with 3 mL of methanol was evaluated, and FBs recovery was improved. Afterwards to optimize the eluente volume, FBs were firstly eluted with 5 mL of methanol and then with 1 mL. Since FBs were not found in the second elution volume, it has been concluded that 5 mL of methanol are sufficient to elute all FBs from the IAC.

IV.4.2. LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION: PRECOLUMN DERIVATISATION

In proposed analytical procedures described for FBs analysis, the most frequently used derivatisation reagent is OPA. More recently NDA was recommended as an alternative agent, since is claimed to produce a more stable isoindole derivative. Yet, as it is much more expensive than OPA, the spread of its use is so far limited (Zuman, 2005).

FB₁ and FB₂ were initially determined in human urine using precolumn derivatisation with NDA. Various precolumn derivatisation techniques for the derivatisation of FBs in maize and maize-based foods involving reaction of the

primary amine group of FBs have been reported. The derivatisation reagents used include, among others, OPA, the most widely used (Bittencourt *et al.*, 2005; Bankole and Mabekoje, 2004; Castro *et al.*, 2004), NDA (Scott and Lawrence, 1995; Dombrink-Kurtzman and Dvorak, 1999; Lombaert *et al.*, 2003; Lino *et al.*, 2006), and 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) (Scott and Lawrence, 1992). However, as far as we know, all the reported studies in the determination of FBs in urine, as well as other biological samples, use OPA as derivatisation reagent (Shephard *et al.*, 1992a; 1995a; b; Shetty and Bhat, 1998; Shephard and Snijman, 1999; Chelule *et al.*, 2000).

However, in contrast to NDA, it has the disadvantage of exhibiting time-dependent degradation, leading to the rapid decay of fluorescence after derivatisation (Bennett and Richard, 1994; Shephard, 1998; Williams *et al.*, 2004; Lino *et al.*, 2006). Derivatisation reaction with NDA was performed according to Chu and Li (1994), and Bennett and Richard (1994), with some modifications (Lino *et al.*, 2006). Therefore, 500 μL of sodium borate buffer, 500 μL of sodium cyanide, and 150 μL NDA were added to the residue which was reconstituted in methanol:water (50:50, v/v). The mixture was heated for 15 min at 60°C in a heating bath and cooled to room temperature before injection in the LC-FD system.

Different mobile phases with a flow of 1.0 mL min⁻¹ were experimented in order to better separate FB₁ from matrix interferents. Initially a mixture of acetonitrile:water:acetic acid (61:38:1, v/v/v) was used. In order to achieve better chromatographic separation from matrix interferents, the acetonitrile proportion was reduced into a final proportion of 55:44:1 (v/v/v), so that FB₁ retention time could be increased. This effort did not produce any improvement.

Another attempt was to increase the acetic acid proportion, being the final proportion 61:37:2 (v/v/v). Since FBs are ionic in solution they do not elute well from most reverse phase columns when they are injected and eluted with neutral unbuffered solvent systems. For best results, the mobile phase should be acidic. This can be accomplished either by the addition of acetic or formic acid to the mobile phase, or by the use of a buffer, that must be volatile for

LC-MS analysis, as ammonium acetate or ammonium formate (Platner, 1999). Although the chromatographic separation has been improved, it was not sufficient to eliminate impurities.

So, to separate FBs from interfering compounds, ion pair chromatography was examined (Miyahara *et al.*, 1996) in order to obtain a longer retention time and, consequently, a better separation. The mobile phase consisted of acetonitrile:water:acetic acid (61:37:2, v/v/v) added of 0.06 mL of triethylamine and 0.1 g of decanesulfonic acid. However, it has been observed that the chromatograms of FB_2 standard solutions presented an interfering peak with the same retention time of FB_1 originated from the derivatisation reaction.

Although, the NDA derivative of FB_1 in samples was not well separated from other components which mainly elute in the front-end of the chromatogram, the best results were achieved with the mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile:water:acetic acid (61:38:1, v/v/v) that has been chosen for analytical determination.

Isocratic analysis under the conditions described above allowed the elution of FB_1 and FB_2 with a mean retention time of 6.81 min and 12.28 min, respectively. Figure IV.5 shows the LC-FD chromatograms of the FBs standard.

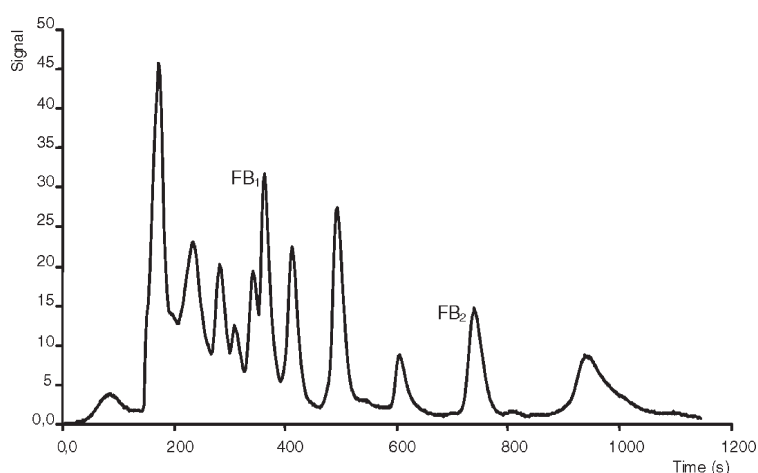


Figure IV.5 Liquid chromatography with NDA precolumn derivatisation chromatogram of a standard solution.

Recovery was tested at a fortification level of 100 ng mL⁻¹, for both FBs. The recovery for FB₂ was 105%. For FB₁, due to the poorer chromatographic separation, the recovery was lower, about 64%.

To accomplish better results, LC with FD detection postcolumn derivatisation was experimented.

IV.4.3. LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION: POSTCOLUMN DERIVATISATION

Reaction of orto-phthalaldehyde with thiols and of the product of this reaction with amines is commonly used for determination of FBs. This reaction is often applied in precolumn and postcolumn derivatisation in liquid chromatography. Among numerous thiols applied in the derivatisation reaction with OPA, MCE is the most widely used. More recently, the use of N-acetyl-L-cysteine (NAC) was reported and claimed to yield a more stable fluorescent product than the others (Zuman, 2005).

Initially, the determination of FB₁ and FB₂ in urine using LC-FD with postcolumn derivatisation was based in the method described by Akyama *et al.* (1998). Briefly, the mobile phase consisted of a mixture of methanol:0.1% TFA (1:1), with a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. The derivatisation reagent consisting of 0.4 M borate buffer (pH 10.0), 0.08% OPA and 0.1% NAC was mixed with the eluate from the analytical column using a second pump at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. The mixture was passed through a stainless tube coil, allowing a reaction time of 9.8 seconds, in a dry reaction thermostatically regulated bath at 50°C. The effluent was spectrofluorimetrically monitored (excitation 340 nm, emission 450 nm). However, this analytical methodology did not allow adequate results in respect to interferents.

Thus, the method reported by Miyahara *et al.* (1996) was evaluated. The conditions used are thoroughly described in Sub-chapter IV.3.6. The use of ion pair chromatography allowed the separation of FBs from interfering compounds. FB₁ and FB₂ presented retention times of about 7.10 and 11.59 min,

respectively. The recoveries of spiked FB_1 and FB_2 at 100 ng mL^{-1} were 76 and 60% (Figure IV.6). It was observed that the redissolution of the evaporated eluate in methanol:water (50:50) allowed better recoveries than the redissolution in acetonitrile:water (50:50).

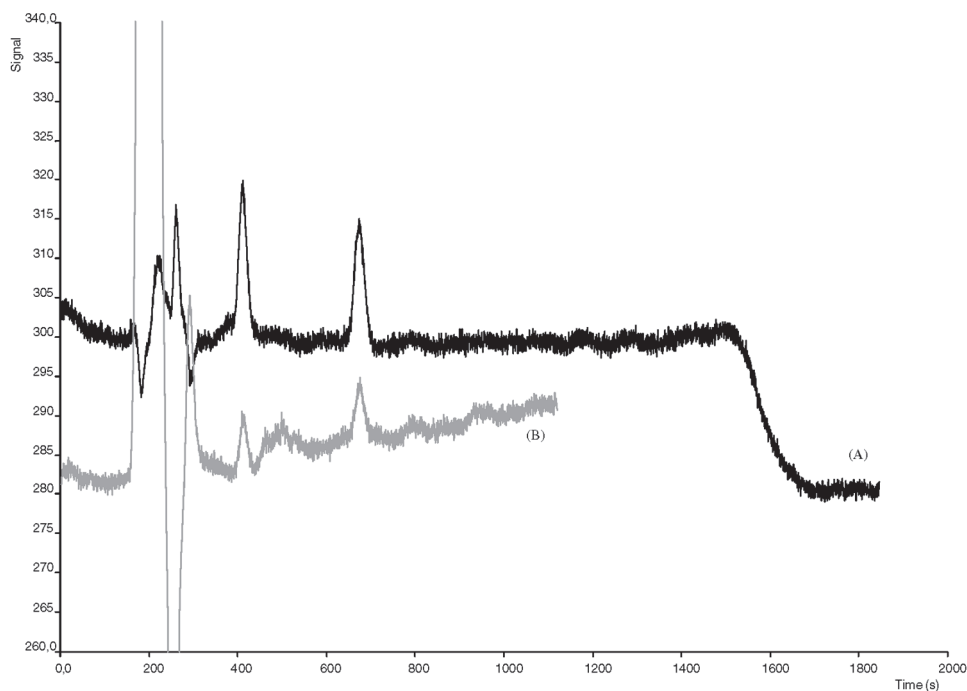


Figure IV.6 Liquid chromatography with OPA postcolumn derivatisation chromatogram of a standard solution (A) and a fortification (B).

Following this methodology clean blanks were obtained, but the reproducibility on different days was not completely satisfactory. In order to improve it, several parameters were studied, such as concentration of OPA and NAC, present always in large excess relative to the concentration of FBs; age of the mixture of OPA-NAC used; temperature of the reaction mixture; and time of reaction. The role of these individual factors was evaluated only qualitatively. It has been verified that the flow of the derivatisation reagent and the temperature of the bath are crucial factors to take in consideration. In what respects to the mixture OPA-NAC, it needs to be prepared freshly every day. The rate of

the formation of the fluorescent species also depends on pH of the buffer used, reaching a maximum intensity between pH 9 and 11 (Zuman, 2005). Based in our results the maximum was achieved at pH 10.

The rate of formation and yields of the fluorescent species vary with changes in concentrations of OPA and thiol in a complex way, which has not been satisfactorily explained. The statement “to date the mechanism of formation of isoindoles has not been established” made in 1985 is still valid. Limited quantitative information is available about the equilibrium established in aqueous solutions of OPA (Zuman, 2005).

So, as the scheme of the reaction yielding the isoindole derivative remains as uncertain as it was 20 years ago, the optimum conditions for each analytical procedure are found empirically (Zuman, 2005).

For developing more reliable analytical methods, it is first essential to get deep knowledge about the equilibria between the individual forms of OPA in aqueous solutions. Due to the complex chemistry of thiols, including their autoxidation, it may be worth considering their replacement, in the initial stages of the analytical procedure, by another nucleophile. The possibility of using a less reactive sulphur compound, like sulfite, seems to be promising (Zuman, 2005). However, the results of our study showed that the replacement of the NAC by sodium sulphite in the derivatisation reagent did not improve the results.

IV.4.4. LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH MASS-MASS DETECTION

The derivatisation disadvantages previously discussed were fully overwhelmed by the application of a MS-MS analytical procedure. The LC-ESI-MS-MS technique applied was similar to that used in the determination of FB₁ and FB₂ in maize and maize-based foods for human consumption.

The calibration curves were obtained using the linear least squares regression procedure of the peak area versus the concentration. The linearity using LC-ESI-MS-MS for FB₁ and FB₂, in the working standard solutions at four determinations of eight concentration levels, between 0.05 and 10.0 µg mL⁻¹,

which corresponds to 1 ng and 200 ng injected, was good as shown by the fact that the correlation coefficients (r^2) were 0.9995 and 0.9991 for FB_1 and FB_2 , respectively (Figure IV.7).

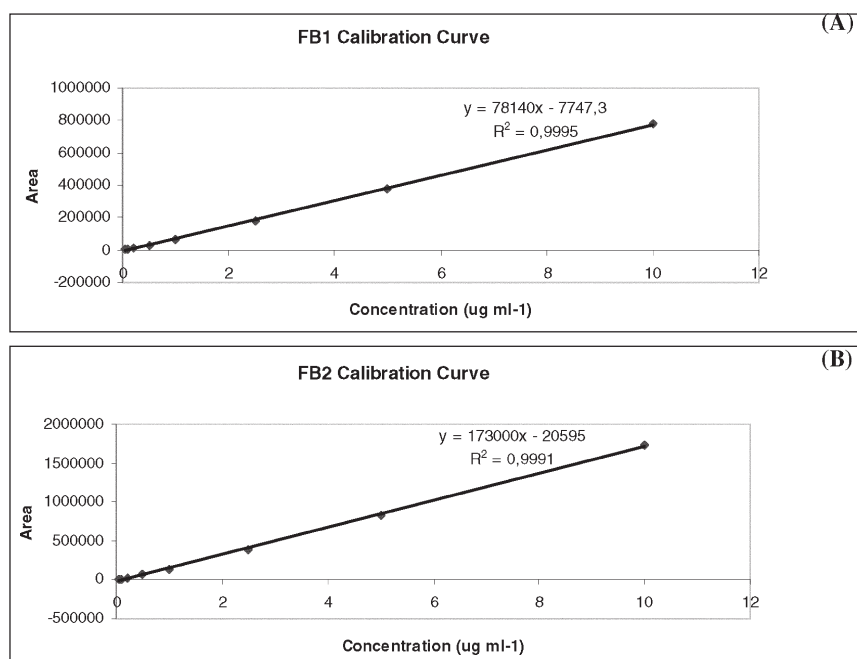


Figure IV.7 FB_1 (A) and FB_2 (B) linearity evaluated between 1 ng e 200 ng injected.

Figure IV.8 and Figure IV.9 show respectively the LC-ESI-MS-MS chromatograms of FB_1 and FB_2 standard, and of one fortified sample at 100 ng mL⁻¹ for each fumonisin.

The limit of quantification, obtained at a signal-to-noise of 10:1, was, for both FBs, 10 ng mL⁻¹. The limit of detection, obtained at a signal-to-noise of 3:1, was 5 ng mL⁻¹ for FB_1 and for FB_2 .

The analytical method proposed allowed good accuracy and precision (Table IV.1). The accuracy was determined by calculating the mean recovery values used for each fortification level. These values oscillated between 76.9 and 99.1% for FB_1 , and between 73.4 and 84.2% for FB_2 at fortification levels of 10 and 100 ng mL⁻¹, respectively. The precision was calculated by intraday repeatability (n=3) and interday repeatability (3 days).

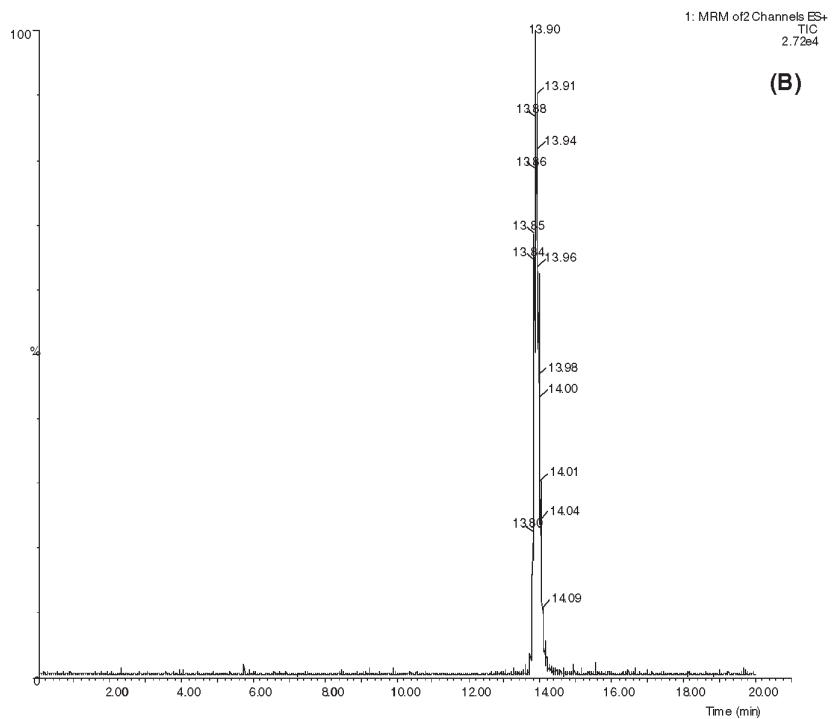
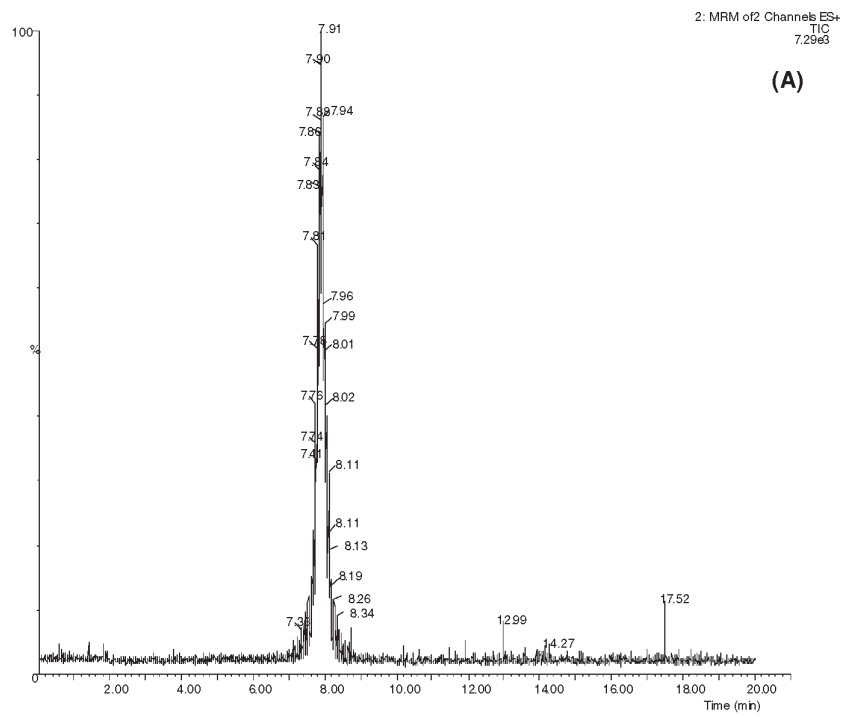


Figure IV.8 LC-ESI-MS-MS chromatograms of FB₁ (A) and FB₂ (B) standard solution at 1 µg mL⁻¹ (mean retention time of 7.5 and 13.85 min for FB₁ and FB₂, respectively).

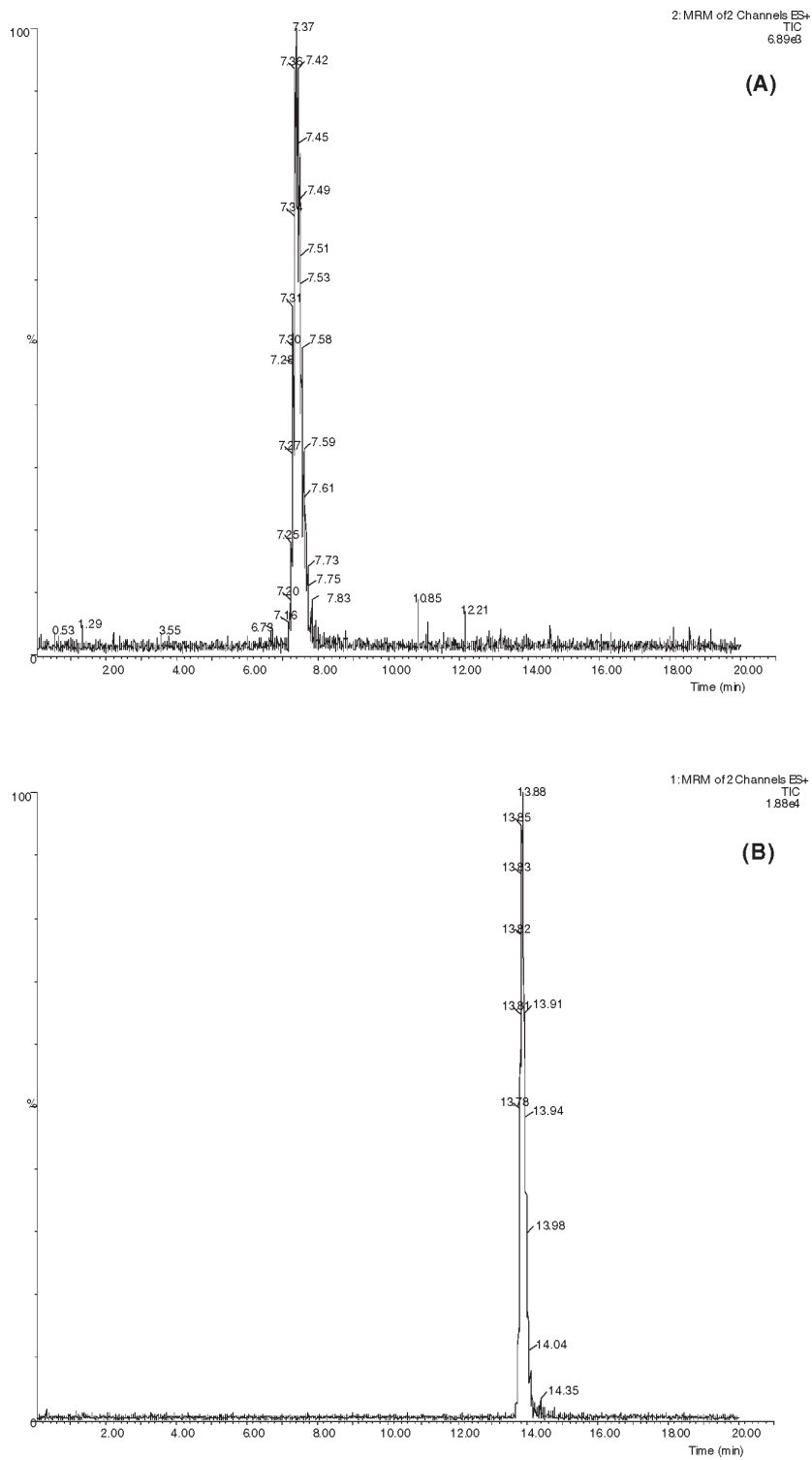


Figure IV.9 LC-ESI-MS-MS chromatograms of a spiked sample at 100 ng mL⁻¹ for both FB₁ (A) and FB₂ (B).

Table IV.1 Accuracy and intra-assay validation results (n=3) and inter-assay (n=9) with the LC-ESI-MS-MS method.

FBs	Fortification level (ng mL ⁻¹)	Recovery mean (%)	RSD intra-day (%)	RSD inter-day (%)
FB ₁	100	99.1	4.7	8.6
	50	89.7	6.9	8.1
	10	76.9	6.9	1.0
FB ₂	100	84.2	0.4	6.2
	50	74	2.5	2.1
	10	73.4	0.2	1.5

The intraday repeatability obtained for FB₁ oscillated between 4.7 and 6.9%, for fortification levels at 50 and 100, respectively. For FB₂ ranged between 0.2 and 2.5% for fortification levels at 10 and 50, respectively. The 3-day repeatability (n=9) obtained for FB₁ oscillated between 1.0 and 8.6% for fortification levels at 10 and 100, respectively. For FB₂, oscillated between 1.5 and 6.2%, for fortification levels at 10 and 100, respectively. In summary, recoveries were higher than 73.4% for fortification levels between 10 and 100 ng mL⁻¹ and the RSDs were lower than 8.6%.

The proposed analytical method was applied to 68 samples of human urine obtained from volunteers from an urban population and a rural one. The presence of FBs was not detected in any of the studied samples.

These results are in accordance with the only study applied to the determination of FB₁ in human urine, published by Shetty and Bhat (1998). Accordingly to Turner *et al.* (1999), this method, with a detection limit of 8 ng mL⁻¹, can only be used to monitor populations with an intake higher than 28 µg FB₁ kg⁻¹ b.w. day⁻¹, assuming that only 0.5% of the fumonisin ingested is excreted in urine, and a 70 kg adult producing 1 L of urine per day. Based on probable daily intakes, populations consuming healthy maize or mouldy maize in Transkei, South Africa (46.6 and 354.9 µg kg⁻¹ b.w. day⁻¹, respectively), and in Linxian and Cixian County, China (231.9 and 486.2 µg kg⁻¹ b.w. day⁻¹, respectively) would have measurable levels of urinary FBs. Measurements of urinary FBs

would not be possible with this methodology in areas with lower levels of contamination or where populations consume smaller quantities of maize, such as those in Europe.

Another publication concerning the determination of FBs in human biological samples was reported by Chelule *et al.* (2000) that analyzed children faeces for the presence of FB₁. Since FB₁ is largely excreted in faeces, this method was applied to samples collected in urban and rural areas of KwaZulu-Natal Province, South Africa. In the samples from rural areas, 33% were positive for FB₁ with levels up to 39 mg kg⁻¹, whereas in urban areas only 6% of samples were positive with levels up to 16.2 mg kg⁻¹. These differences reflected variation in FB₁ contamination levels of the maize consumed as a dietary staple (mean 2.2 mg kg⁻¹ in the rural maize samples vs 0.3 mg kg⁻¹ in samples from urban households (Chelule *et al.*, 2001; Shephard *et al.*, 2007).

Finally, in 2003, Sewram *et al.* (2003) studied for the first time the accumulation of FBs in human hair of population clusters exposed to contaminated maize, assessing, in this way, past fumonisin exposure. Composite human hair samples collected from different districts of the Transkei region of South Africa showed mean FB₁ levels ranging from 22 to 33 µg kg⁻¹, with low FB₂ mean levels (n.d. to 11 µg kg⁻¹) (Sewram *et al.*, 2003; Shephard *et al.*, 2007).

Reduced levels of exposure, and the rapid elimination of these toxins result in low bioavailability, what means that the direct quantification of free FBs might be less reliable to be used as biomarker (Shephard *et al.*, 2007).

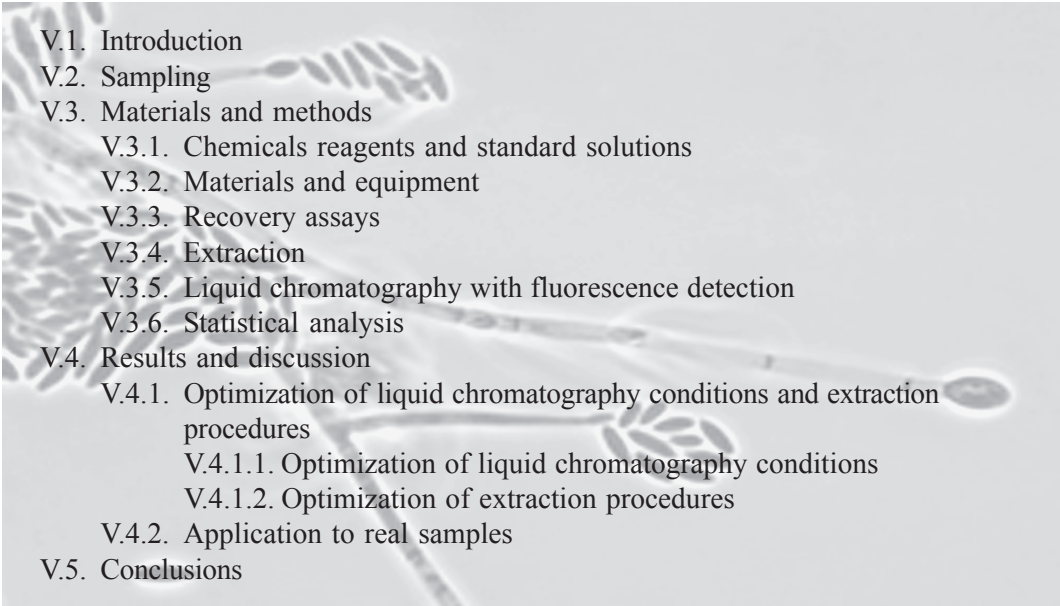
IV.5. CONCLUSIONS

In conclusion, the precolumn derivatisation does not allow an adequate separation of FB₁ from interferents of the urine matrix. IAC clean-up and LC-FD quantification with postcolumn derivatisation, although never used in the determination of FBs in urine, allowed good recoveries and presented higher specificity, when compared with precolumn derivatisation. However, the product of the postcolumn derivatisation reaction is known to be an isoindole

derivative, and the reaction paths of its formation are still not fully understood. Better knowledge of chemical processes involved seems essential for development of more reliable and reproducible procedures for determination of FBs in urine using postcolumn derivatisation.

Finally, the IAC clean-up and LC-ESI-MS-MS method proved to be an accurate, precise, and sensitive method. However, the contamination levels that the studied populations are usually submitted to cause low intakes that the method could not detect, yet it could be applied in the analysis of more exposed populations, with FBs urine levels higher than 10 ng mL⁻¹.

CAPÍTULO V – DETERMINATION OF THE RATIO SPHINGANINE- SPHINGOSINE IN HUMAN URINE

- 
- V.1. Introduction
 - V.2. Sampling
 - V.3. Materials and methods
 - V.3.1. Chemicals reagents and standard solutions
 - V.3.2. Materials and equipment
 - V.3.3. Recovery assays
 - V.3.4. Extraction
 - V.3.5. Liquid chromatography with fluorescence detection
 - V.3.6. Statistical analysis
 - V.4. Results and discussion
 - V.4.1. Optimization of liquid chromatography conditions and extraction procedures
 - V.4.1.1. Optimization of liquid chromatography conditions
 - V.4.1.2. Optimization of extraction procedures
 - V.4.2. Application to real samples
 - V.5. Conclusions

V.1. INTRODUCTION

Fumonisin (FBs) are ubiquitous contaminants of cereal grains (Cai *et al.*, 2007; Shephard *et al.*, 2007), occurring worldwide in maize and derived foods (Shephard *et al.*, 1996a). FBs structural similarity with sphinganine (Sa) and sphingosine (So), causes inhibition of sphingolipid biosynthesis (Soriano *et al.*, 2005; Shephard *et al.*, 2007), and consequently a diversity of animal and human health problems showing a species-specific toxicity, previously referred in Sub-chapter I.1.4. The question if these toxins are related to human esophageal cancer remains unanswered (Group 2B) (Seefelder *et al.*, 2002; IARC, 2002).

To know the FBs impact on human health is essential to find reliable estimates of fumonisin exposure in individuals through the evaluation of the estimated daily intake (EDI), especially those in rural subsistence farming communities whose populations may be exposed to higher levels of these toxins and through the measurement of biomarkers of exposure that can reflect the effective exposure and account for variations in food contamination levels, food consumption, diet composition, and food preparation techniques, as well as overcoming the problems of representative sampling and accurate measurement of these parameters (Shephard *et al.*, 2007).

In order to monitorize human exposure and assure public health (Prelusky *et al.*, 1996; Chelule *et al.*, 2000), the development, validation, and application of biomarkers have been a priority for research on these toxins (Cai *et al.*, 2007).

Based on the absence of measurable metabolites, FB₁ has been suggested as a biomarker (Shephard *et al.*, 2007), however, due to its toxicokinetic behaviour, the direct measurement of FB₁ in biological fluids may be a possible biomarker for studying short-term and high exposure (Cai *et al.*, 2007).

The most extensive research for a FBs biomarker has been based on its biochemical mode of action, namely the inhibition *de novo* sphingolipid biosynthesis. In this biochemical pathway inhibition of ceramide synthase typically leads to an elevation in sphinganine levels and, consequently, in the ratio of sphinganine to sphingosine (Shephard *et al.*, 2007). Altered sphingolipid metabolism, namely accumulation of free Sa within cells, is cytotoxic, whereas the balance between endogenous ceramides determines whether cells die or survive (Tardieu *et al.*, 2006).

This biomarker usefulness has been demonstrated in different animal species, and in humans (Wang *et al.*, 1991; Riley *et al.*, 1994a; Shephard *et al.*, 1996b; Yoo *et al.*, 1996; Castegnaro *et al.*, 1996; 1998; Solfrizzo *et al.*, 1997; 2004; Westhuizen *et al.*, 1999; Abnet *et al.*, 2001; Qui e Liu, 2001; Seefelder *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2003; Tardieu *et al.*, 2006).

Riley *et al.* (1994b) reported, for the first time, an analytical methodology for the application of the ratio Sa/So as a specific biomarker for FBs exposure based on a complex liquid-liquid extraction followed by base hydrolysis and liquid chromatography with fluorescence detection with prior derivatisation with OPA. However, this procedure is time-consuming and labour-intensive (Turner *et al.*, 1999; Seefelder *et al.*, 2002), and a prerequisite for large scale biomarker studies is ease and rapidity of repeated measurements (Turner *et al.*, 1999).

A simpler method involving isolation of exfoliated cells from animal and human urine was developed (Castegnaro *et al.*, 1996; Qiu and Liu, 2001; Turner *et al.*, 1999). Another simpler alternative method is based on the use of hand-made silica mini-column clean-up of the chloroform extract from the alkalized urine or plasma (Solfrizzo *et al.*, 1997; 2004; Shephard and Westhuizen, 1998; Westhuizen *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 1999).

The use of other clean-up procedures such as solid-phase extraction with Oasis HLB columns, that have only been applied in the quantification of sphingosine 1-phosphate (So 1-P) in human plasma (Butter *et al.*, 2005), has never been reported.

Concerning derivatisation, the majority of the authors prefers to determine Sa and So-OPA derivatives. Cho *et al.* (2002) made a comparative study of

NDA and OPA for chromatographic detection of sphingoid bases and verified that the NDA method is useful for the quantitative determination of sphingoid bases. The high stability and intense fluorescence derivatives extend the quantitative range, allowing the detection of small amounts.

This work shows the optimization results of LC conditions and extraction procedures for the determination of the Sa/So ratio, which increase has been vastly proposed as a biomarker, in human urine. The optimized analytical methodology is based on the isolation of exfoliated cells, followed by extraction with ethyl acetate, derivatisation with NDA and determination of Sa and So with LC-FD. This method was then applied to the analysis of urine samples from one rural and one urban population.

V.2. SAMPLING

The same urine samples, previously analyzed for the determination of FB₁ and FB₂ in human urine, were used for the analysis of Sa, and So (Sub-chapter IV.2).

V.3. MATERIALS AND METHODS

V.3.1. CHEMICALS REAGENTS AND STANDARD SOLUTIONS

HPLC grade acetonitrile and methanol, phosphoric acid, and chloroform were purchased from Carlo Erba (Milan, Italy). Potassium cyanide, potassium hydroxide, potassium chloride, ammonia solution at 25%, hexane, silica gel 60, sodium tetraborate, and acetic acid, were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The water used was bi-distilled. Sa and So standards, and NDA were obtained commercially from Sigma Chemicals (Co, St. Louis, USA). Solid phase extraction columns, Oasis HLB, a water-wettable copolymer for reversed phase SPE 6 cc (200 and 500 mg), were from Waters (Etten Leur, The Netherlands).

The NDA solution was prepared at 0.5 mg mL⁻¹ in acetonitrile. The potassium cyanide was prepared at 0.13 mg mL⁻¹. Sodium borate solution 0.05M was adjusted at pH 9.5 with 1 N NaOH.

The stock solutions of Sa and So, purchased from Sigma Chemicals, were made in methanol:water (9:1) at 1000 µg mL⁻¹. Intermediate solutions were prepared at 50 µg mL⁻¹, and at 5 µg mL⁻¹ with methanol:water (9:1). For fortification assays, two work solution were prepared with methanol:water (9:1) at 125 ng mL⁻¹ and at 50 ng mL⁻¹ for both sphingoid bases.

For calibration curve, work solutions were prepared by dilution at the following concentrations: 1.0, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, and 0.025 µg mL⁻¹. All solutions were kept in amber flasks to protect from light and standards were at 4°C or freezed when not in use.

V.3.2. MATERIALS AND EQUIPMENT

In this study the following material and equipment was used:

- centrifuge Meditronic S-599 (Selecta, Barcelona, Spain);
- vortex mixer Retsh (Haan, Germany);
- rotative shaker Edmund Bühnen 7400 Tübingen HL2 (Germany);
- heating bath;
- Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA);
- membrane filter 0.45 µm pore size
- ultrasonic bath Sonorex RK 100 (Berlin, Germany).

The liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FD) equipment was similar to that used in the analysis of FBs in foods and in urine (Sub-chapter III.3.2; IV.3.2) excepting for the guard-column and analytical column used that consisted of:

- guard-column C₁₈ Supelco (20 x 4.6 mm) (Bellefonte, PA, USA)
- analytical column C₁₈ Supelcosil LC-ABZ+plus column 5 µm (150 mm x 4.6 mm i.d.).

V.3.3. RECOVERY ASSAYS

Recovery experiments for Sa and So were performed on urine samples containing no detectable levels of Sa and So, for three replications, with known amounts of FBs at final concentrations of 6.0, 3.0, and 0.6 ng mL⁻¹.

V.3.4. EXTRACTION

The extraction methodology used in this study, for the analysis of Sa and So in urine, was a modification of that described by Castegnaro *et al.* (1996; 1998) and Qiu and Liu (2001). Briefly, 5 mL of female urine or 50 mL of male urine were centrifuged at 1000 g for 15 min. The supernatant was discarded. For the case of male urine and to avoid interferences, the residue was then washed with 14 mL of distilled water, and centrifuged once more. The solid residue was then diluted with 5 mL of distilled water, alkalized with 125 μ L of 1 mol L⁻¹ KOH solution, and extracted with 5 mL of ethyl acetate for 20 min by gentle rotation, to prevent the formation of an emulsion, on a shaker with a speed of 18 rpm. The solution was centrifuged at 1000 g for 20 min, and the ethyl acetate phase was collected. The aqueous layer was extracted again and the two ethyl acetate extracts were pooled. The solvent was evaporated to dryness with N₂ in a heating bath at 60°C.

V.3.5. LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION

For LC-FD analysis, the residue was reconstituted in 100 μ L methanol:water (9:1, v/v) and determination and quantification were carried out on the NDA-sphingoid base derivatives, accordingly to Cho *et al.* (2002), with some modifications. Therefore, 100 μ L 0.05 M sodium borate buffer (pH 9.5), 100 μ L KCN, and 100 μ L NDA reagent were added to the reconstituted residue. The mixture was heated for 25 min at 60°C in a heating bath, and injected into the LC system after the derivatized mixture cooled to room temperature. The

mobile phase, that consisted of acetonitrile:water (90%), after filtration and degasification in an ultrasonic bath, was maintained at a flow rate of 1 mL min⁻¹, at room temperature. An excitation wavelength of 252 nm and an emission wavelength of 483 nm were used.

Detection and quantification of individual sphingoid bases in the samples were achieved by comparing the sample chromatogram with the standard mixture chromatogram. Isocratic analysis under the conditions described in Subchapter V.3.5 allowed the elution of So and Sa with a mean retention time of 13.32 min and 16.54 min, respectively (Figure V.2).

V.3.6. STATISTICAL ANALYSIS

Database management and statistical analysis of the results of Sa, So and Sa/So ratios were performed using SPSS (Statistical Package for the Social Science), Microsoft version 16.0. The Pearson ChiSquare test was used to test for significant differences between groups. If $p \leq 0.05$ (two-tailed) difference was considered to be statistically significant. For statistical analysis, if the concentration was below the limit of quantification (LOQ) it was set to 50% of that limit, and the mean and SD were calculated.

V.4. RESULTS AND DISCUSSION

V.4.1. OPTIMIZATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY CONDITIONS AND EXTRACTION PROCEDURES

V.4.1.1. OPTIMIZATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY CONDITIONS

The calibration curves were obtained using the linear least squares regression procedure of the peak area *versus* the concentration. The linearity for Sa and So, in the working standard solutions at four determinations of five concentration

levels, between $0.025 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, which corresponds to 0.03 ng and 1.25 ng injected, respectively, was good as shown by the fact that the correlation coefficients (r^2) were 0.9994 for Sa and 0.9984 for So (Figure V.1).

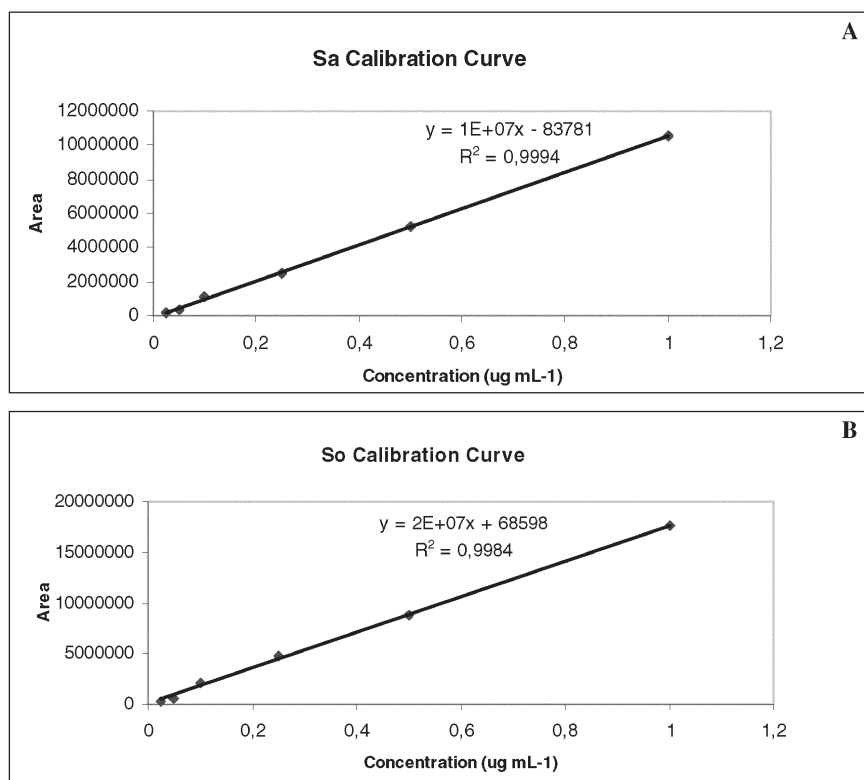


Figure V.1 Sa linearity (A) and So linearity (B) evaluated between 0.03 ng and 1.25 ng injected.

Figure V.2 shows the LC-FD chromatograms of the Sa and So standard, and one fortified sample at 3 ng mL^{-1} for each sphingoid base, and one female and one male sample.

Although the great majority of the authors (Riley *et al.*, 1994b; Yoo *et al.*, 1996; Shephard *et al.*, 1996b; Castegnaro *et al.*, 1996; 1998; Solfrizzo *et al.*, 1997; 2004; Tran *et al.*, 2003), when using LC-FD for the determination of sphingoid bases, prefer OPA to derivatize, claiming that Sa and So OPA derivatives are stable at 4°C for 24 hours (Turner *et al.*, 1999), in the present study NDA was chosen as derivatisation reagent.

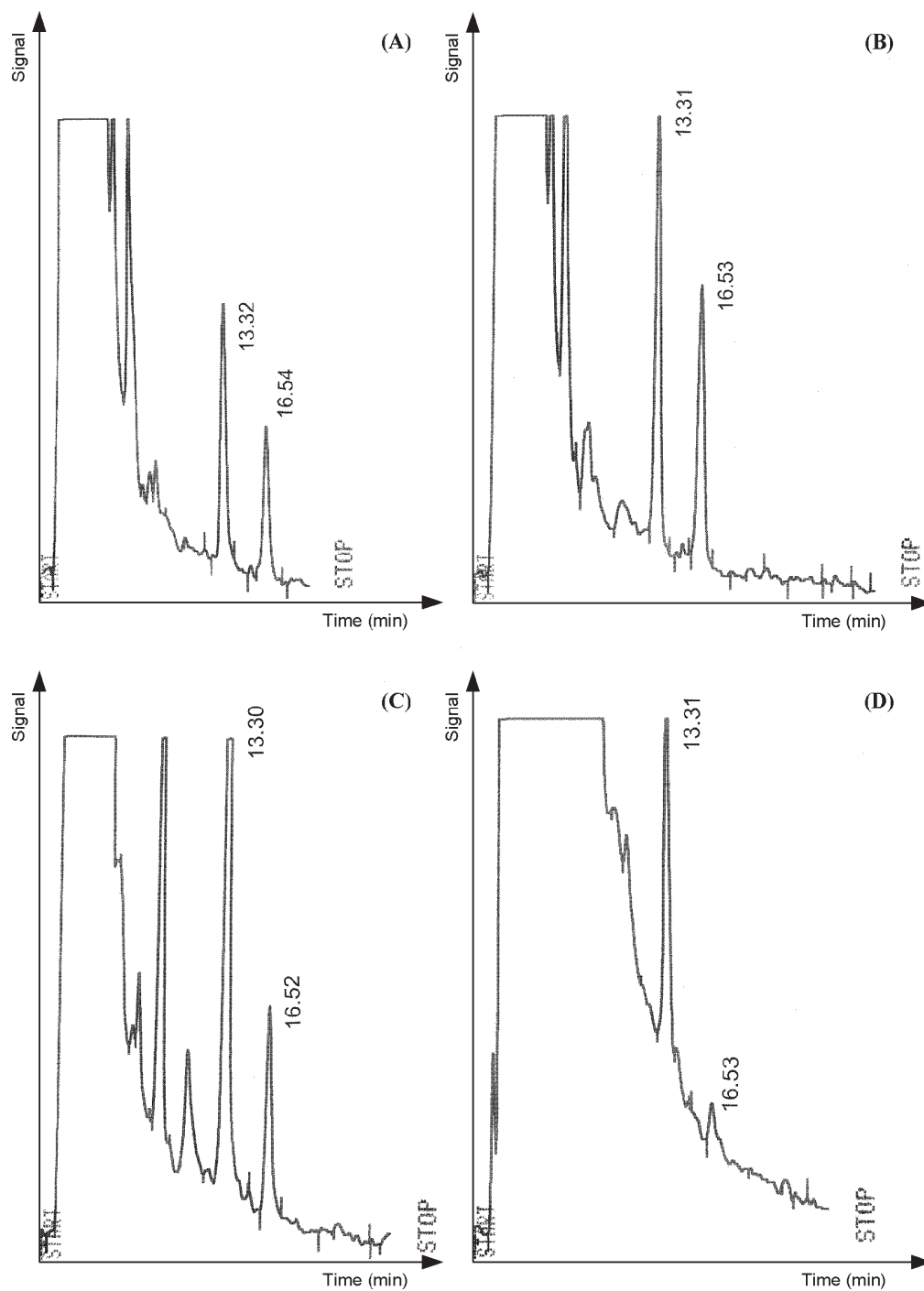


Figure V.2 LC-FD chromatograms of A: Sa and So standard solution at 125 ng mL⁻¹ (mean retention time of 13.32 and 16.54 min for So and Sa, respectively); B: a spiked sample at 3 ng mL⁻¹ for each sphingoid base; C: a female sample with 3.62 ng mL⁻¹ and 9.45 ng mL⁻¹ of Sa and So, respectively; and D: a male sample with 0.18 ng mL⁻¹ and 0.63 ng mL⁻¹ of Sa and So, respectively.

Cho *et al.* (2002) made a comparative study of NDA and OPA fluorogenic reagents for chromatographic detection of sphingoid bases and verified that NDA derivatives present higher stability and more intense fluorescence allowing lower detection levels.

Therefore, the LC spectrofluorimetric conditions used in the present study were accordingly to Cho *et al.* (2002), with minor modifications. These modifications concerned the replacement of NaCN by KCN, as used in the derivatisation of FBs in foods and precolumn derivatisation of FBs in human urine (sub-chapters III.3.5 and IV.3.5), the use of the mixture methanol:water (9:1) instead of ethanol to dissolve the standards and the evaporated extract, and the volumes used in the derivatisation reaction in order to achieve better sensitivity for Sa. Consequently, instead of using 40 μ L of standard/extract, 40 μ L of sodium tetraborate buffer, 20 μ L of cyanide ion, and 20 μ L of NDA, 100 μ L of each were used.

In the studies by Castegnaro *et al.* (1996) and Riley *et al.* (1994b) a C20 dihydrosphinganine internal standard was used for calculating the recoveries and quantification of the free So and Sa in urine and serum samples. This was not done in the present study because the C20 internal standard was not available, and because the Sa/So ratio has been shown to be an equally good marker for fumonisin exposure when compared with the increase in free Sa alone (Riley *et al.* 1994b; Solfrizzo *et al.*, 1997; Qui and Liu, 2001).

This conditions allowed the elution of So and Sa with a mean retention time of 13.32 min and 16.54 min, respectively. As expected, the elution order is to a large extent related to the hydrophobicity of the derivatized sphingoid bases. The more hydrophobic NDA derivatives have longer retention time in the chromatographic run (Cho *et al.*, 2002) (Figure V.2).

V.4.1.2. OPTIMIZATION OF EXTRACTION PROCEDURES

Since the majority of the methods involve time-consuming and labour-intensive extraction procedures, based on numerous steps of liquid-liquid extraction, base and acid hydrolysis (Riley *et al.*, 1994b; Yoo *et al.*, 1996; Turner

et al., 1999), and consequently not ideally suited to the analysis of large numbers of samples (Castegnaro *et al.*, 1996), in the present study samples were firstly extracted accordingly to the method of Solfrizzo *et al.* (1997) with chloroform, following a clean-up step with SPE Oasis HLB columns accordingly to Butter *et al.* (2005). The purpose was to avoid the hand-made silica-gel minicolumns used in the clean-up step by some authors (Solfrizzo *et al.*, 1997; 2004; Shephard and Westhuizen, 1998; Westhuizen *et al.*, 1999) that do not present adequate precision, and did not allow good results.

Initially, the Oasis clean-up did not allow good results. The conditions used by Butter *et al.* (2005) that have validated an LC method to quantify So 1-P in human plasma using SPE with Oasis HLB columns followed by derivatisation with fluorescence detection, did not allow any recovery, neither using Oasis 200mg, nor using Oasis 500mg. Therefore, and since the methodology used with these SPE columns greatly depends on the characteristics of the studied compounds, namely its pKa, that in the case of sphingoid bases is not well defined, the clean-up procedure had to be adjusted to Sa and So by the passage of standard solution through the Oasis column.

Accordingly to the protocol of the Oasis columns, and in order to increase retention, the pH of the conditioning and washing steps must be decreased for acidic analytes (below the pKa of the compound). For basic compounds, the pH is raised (above the pKa of the compound). In the elution step the pH should be changed so that the analyte can elute. Some authors argue that the pKa of So is 6.7 and that the pKa varies among the analogues (Merril *et al.*, 1989), others defend that pKa of the sphingoid bases is 9.1 (<http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/lcb/index.htm>). In this way the procedure for acidic compounds and for basic compounds was tested using 200 mg columns. The attempts made are resumed in the Table V.1.

As shown in referred table, when the elution procedure for basic compounds was applied the recoveries were increased. Moreover, it was concluded that 10 mL of methanol acidified at pH 4 with acetic acid was sufficient to elute the sphingoid bases from the Oasis column.

Table V.1 Optimization of the clean-up Oasis procedure for Sa and So standard solutions.

Conditioning	Wash	Elution	Recoveries (%)
3 mL MeOH 3 mL H ₂ O 2 mL MeOH:H ₃ PO ₄	—	1) 4 mL MeOH 2) 4 mL MeOH:H ₂ O	1) Sa: 13; So: 18 2) —
3 mL MeOH 3 mL H ₂ O	2 mL 5% MeOH:H ₂ O 2 mL 2% NH ₄ OH in 5% MeOH:H ₂ O	4 mL 2% CH ₃ COOH in 5% MeOH:H ₂ O	—
3 mL MeOH 3 mL H ₂ O	2 mL 5% MeOH:H ₂ O 2 mL 2% NH ₄ OH in 5% MeOH:H ₂ O	4 mL 2% CH ₃ COOH in 90% MeOH:H ₂ O	Sa: 1.7; So: 2.2
3 mL MeOH 3 mL H ₂ O	4 mL 5% MeOH:H ₂ O	5 mL MeOH	Sa: 47; So: 45
3 mL MeOH 3 mL H ₂ O	2 mL H ₂ O	1) 4 mL MeOH 2) 2 mL MeOH 3) 3 mL MeOH:10%CH ₃ COOH pH 5–6 4) 3 mL MeOH:0.35M NH ₄ OH pH 8.9	1) Sa: 32; So: 48 2) Sa: 39; So: 19 3) Sa: 10; So: 8 4) Sa: 3; So: 2
3 mL MeOH 3 mL H ₂ O	2 mL H ₂ O	1) 10 mL MeOH 2) 3 mL MeOH 3) 2 mL MeOH:0.35M NH ₄ OH pH 9.35	1) Sa: 65; So: 71 2) Sa: 3; So: 3 3) Sa: 3; So: 2
3 mL MeOH 3 mL H ₂ O	2 mL H ₂ O	1) 6 mL MeOH 2) 4 mL MeOH: CH ₃ COOH pH 4 3) 3 mL MeOH:0.35M NH ₄ OH pH 9.35	1) Sa: 54; So: 60 2) Sa: 8; So: 9 3) Sa: —; So: —
3 mL MeOH 3 mL H ₂ O	2 mL H ₂ O	1) 6 mL MeOH: CH ₃ COOH pH 4 2) 4 mL MeOH: CH ₃ COOH pH 4 3) 3 mL MeOH:0.35M NH ₄ OH pH 9.35	1) Sa: 89; So: 90 2) Sa: 2; So: 2 3) Sa: —; So: —

However, because of the polarity of the samples, the procedure for standards did not provide good results when fortified samples were applied into the column. Recoveries of about 80% for So and 100% for Sa were only accomplished when 1 mL of centrifuged urine was diluted with methanol, and 1 mL of the mixture, after fortification at 1.6 µg mL⁻¹, was applied into the Oasis, previously conditioned with methanol and water. After an washing-step with water, Sa and So were eluted with methanol:acetic acid pH 4.

For the low Sa and So levels usually found in urine, especially in male individuals, the volume of the sample that reached the Oasis column was not enough to allow low quantification limits, and an higher volume would lead to many chromatogram interferences.

Therefore, the direct method based on that reported by Castegnaro *et al.* (1996) and Qiu and Liu (2001) was evaluated. Firstly, attempts were made in order to extract the sphingoid bases, Sa and So, from the whole urine. However,

the recoveries were not satisfactory, in the order of 5 and 8% for Sa and So, respectively.

The introduction of an agitation step, accordingly to Castegnaro *et al.* (1998), for 5 min, during the extraction with ethyl acetate improved the recoveries to 18% for Sa and 21% for So. When the extraction time was increased up to 20 min, using a shaker, the recoveries were around 40% for each sphingoid base. To improve the percentage of recovery, and as the formation of an emulsion was observed that, according to Castegnaro *et al.* (1998), does not allow total separation of sphingolipids, KCl was added before the extraction, following the suggestion of the above mentioned authors. However, this procedure did not improve the results achieved.

According to Castegnaro *et al.* (1996), if the Sa/So ratio is measured in the whole urine from female origin as opposed to cells only, comparable chromatograms and similar ratios are observed. Therefore, the method can be applied equally to the whole urine or isolated cells. The same was observed in our study since no compounds were found in the rejected liquid phase.

Nonetheless, if the whole males' urine is used, as fewer cells are present in their urine relatively to females' urine, much larger sample volumes are required in their analysis, up to 50 mL, leading to more complex chromatograms, in terms of interferences. Thus, the isolation of cells before extraction of male urine is fundamental (Castegnaro *et al.*, 1996). It should be stressed that the difference in the number of cells released in the urine of both gender, observed by Castegnaro *et al.* (1996), Solfrizzo *et al.* (1997), and Qui and Liu (2001), is thought to be due to the characteristics of the genital apparatus, which in the case of females allows contamination by epithelial cells from the surrounding genital organs tissue. In the case of males the exfoliated cells released are derived principally from the kidney and urinary tract (Castegnaro *et al.*, 1996; Qui and Liu, 2001).

Briefly, the analytical methodology applied in the current study involved the isolation of exfoliated cells from 5 mL of female or 50 mL of male urine. The residue of males was washed with distilled water. After dilution of the

residue with water, alcalitization with KOH, and a two step extraction with ethyl acetate, the ethyl acetate fractions were pooled and evaporated.

The accuracy was determined by calculating the mean recovery values used for each fortification level (Table V.2). The recovery values for Sa oscillated between 87.0% and 106.2% for fortification levels at 0.6 and 3 ng mL⁻¹, respectively. For So ranged from 101.1% to 100.4%, for levels at 3.0 and 6.0 ng mL⁻¹, respectively. The precision was calculated by intraday repeatability (n=3) and interday repeatability (3 days). For Sa, the intraday repeatability obtained oscillated between 6.8 and 7.6% for fortification levels at 0.6 and 6.0 ng mL⁻¹, respectively. For So ranged from 7.2 to 12.3% at 3.0 and 6.0 ng mL⁻¹, respectively. The 3-day repeatability (n=9) obtained for Sa, oscillated between 2.0 and 13.8% for fortification levels at 0.6 and 3.0 ng mL⁻¹, respectively. For So these values were 6.9 and 4.5% at 0.6 and 3.0 ng mL⁻¹, respectively. In summary, recoveries were higher than 87% for fortification levels between 0.6 and 6 ng mL⁻¹ and the RSDs were lower than 13.8%.

The quantification limits were 0.6 and 0.06 ng mL⁻¹, for females and males, respectively. The detection limit was 0.2 ng mL⁻¹ for females, and 0.02 ng mL⁻¹ for males.

Table V.2 Accuracy and intra-assay validation results (n=3) and inter-assay (n=9) with the optimized method.

Sphingoid bases	Fortification level (ng mL ⁻¹)	Recovery mean (%)	RSD within-day-(%)	RSD between-day (%)
Sa	0.6	87.0	6.8	2.0
	3.0	106.2	7.2	13.8
	6.0	99.0	7.6	8.2
So	0.6	101.0	7.5	6.9
	3.0	101.1	7.2	4.5
	6.0	100.4	12.3	5.1

V.4.2. APPLICATION TO REAL SAMPLES

Using the above described analytical methodology, 68 samples of human urine were analyzed. Thirty samples were from healthy donors from a rural area, Pereira, a village near the city of Coimbra, and 38 samples from healthy individuals from an urban area, the city of Coimbra, Portugal. The donors were asked to collect their samples from the first morning portion.

The results obtained for frequency, range, mean concentration, standard deviation, and *p* values of Sa, So, and Sa/So are shown in Table V.3 and Figure V.3.

Regarding the rural population, Sa was detected in 9 out of 16 female samples (56.3%), and in 3 out of 14 male samples (21.4%), which correspond to a total frequency of detection of 40%. So was found in 15 female samples (93.8%), and in 8 male samples (57.1%), which correspond to a total frequency of detection of 76.7%. The Sa concentrations found in female samples ranged between 0.81 and 7.37 ng mL⁻¹, with a mean of 1.30±1.91 ng mL⁻¹. In the males urine Sa ranged between 0.19 and 0.85 ng mL⁻¹, with a mean of 0.1±0.24 ng mL⁻¹. In relation to So, the concentration found in female urine ranged between 0.6 and 22.3 ng mL⁻¹, with a mean of 3.85±5.31 ng mL⁻¹. In males So varied from 0.07 to 2.22 ng mL⁻¹, with a mean of 0.42±0.79 ng mL⁻¹. The Sa/So ratio was in the range of 0.19-0.95 and 0.11-0.40, for females and males, respectively, with means of 0.48±0.22 for females, and 0.30±0.16 for males (Table V.3; Figure V.3).

Concerning the urban population, Sa was detected in 13/19 female samples (68.4%), and in 1/19 male samples (5.3%), which corresponds to a total frequency of detection of 36.8%. So was found in 18 female samples (94.7%), and in 13 male samples (68.4%), which correspond to a total frequency of detection of 81.6%. Sa levels in female samples were between 0.6 and 17.48 ng mL⁻¹, with a mean of 2.53±4.51 ng mL⁻¹. In males Sa was found in only one sample in a level of 0.18 ng mL⁻¹, with a mean of 0.01±0.041 ng mL⁻¹. So levels present in female urine ranged between 0.86 and 34.97 ng mL⁻¹, with a mean of 5.89±8.62 ng mL⁻¹. In males So varied between 0.07 and 0.63 ng mL⁻¹, with a mean of 0.17±0.19 ng mL⁻¹. Sa/So ratio was in the range of 0.23–0.78 for

females, and was 0.29 in the only male sample where was possible to establish it, with mean of 0.44 ± 0.18 for females (Table V.3; Figure V.3).

Table V.3 Frequency (%), range, mean concentration, standard deviation (ng mL^{-1}), and *p* value of Sa, So and Sa/So in the studied rural and urban populations.

Population /Gender	Frequency (%)		Range			Mean \pm SD			<i>p</i> value		
	Sa	So	Sa (ngmL^{-1})	So (ngmL^{-1})	Sa/So	Sa (ngmL^{-1})	So (ngmL^{-1})	Sa/So	Sa	So	Sa / So
Urban	36.84	81.58	0.18–17.48	0.07–34.97	0.23–0.78	1.27 ± 3.39	3.03 ± 6.67	0.42 ± 0.17	0.238	0.454	0.937
Rural	40.00	76.67	0.19–7.37	0.07–22.23	0.11–0.95	0.76 ± 1.53	2.31 ± 4.29	0.43 ± 0.22			
Urban F	68.42	94.74	0.6–17.48	0.86–34.97	0.23–0.78	2.53 ± 4.51	5.89 ± 8.62	0.44 ± 0.18	0.937	1.000	0.972
Rural F	56.25	93.75	0.81–7.37	0.6–22.3	0.19–0.95	1.30 ± 1.91	3.85 ± 5.31	0.48 ± 0.22			
Urban M	5.26	68.42	0.18	0.07–0.63	0.29	0.01 ± 0.041	0.17 ± 0.19	–	0.235	0.655	0.237
Rural M	21.43	57.14	0.19–0.85	0.07–2.22	0.11–0.40	0.1 ± 0.24	0.42 ± 0.79	0.30 ± 0.16			

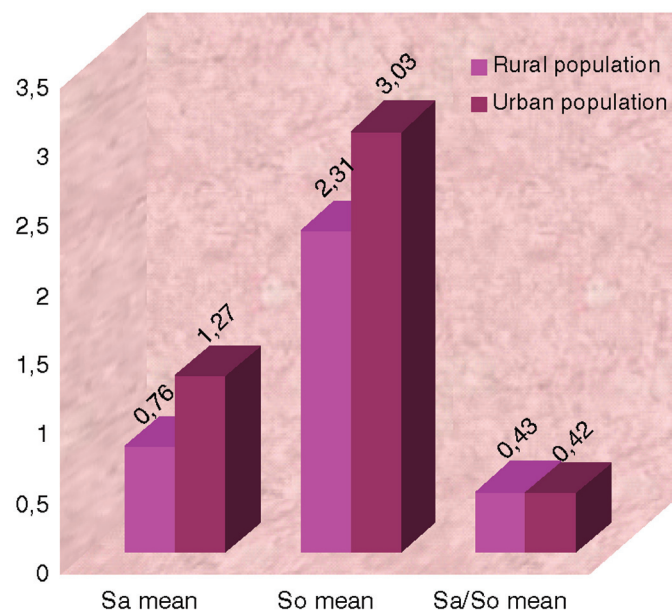


Figure V.3 Sa, So and Sa/So means for rural and urban population.

Significant differences were not found when the results of Sa, So, and Sa/So of females were compared between rural and urban population, with *p* values of 0.937, 1.000 and 0.972, for Sa, So, and Sa/So respectively. The same

was observed for Sa, So, and Sa/So of males when the comparison was done between rural and urban population, with p values of 0.235, 0.655, and 0.237, respectively. When the total of urban and rural population were compared the p values obtained for Sa, So, and Sa/So the were 0.238, 0.454, and 0.937, respectively (Table V.3).

The sphingoid bases detected in urine result from the cellular content of urine, and their levels are influenced by the number of these cells, so only the value of the Sa/So ratio would be relevant as a biomarker (Shephard *et al.*, 2007). In both male and female urines, the variability in the levels of Sa and So were greater than for Sa/So ratios. Thus, as defended by many authors (Solfrizzo *et al.*, 1997; 2004; Qiu and Liu, 2001), the urinary Sa/So ratio is a more useful biomarker than Sa or So in evaluating exposure to FBs.

The interindividual variation observed in Sa/So ratios is similar to that seen in the studies of Castegnaro *et al.* (1996; 1998).

Furthermore, there are environmental and genetic factors that can influence the concentration of sphingoid bases in a given individual (Castegnaro *et al.*, 1998). Solfrizzo *et al.* (1997) observed that the urine analysis of a 28 year old female, not exposed to FBs, tested in different periods, with and without inflammation of the genital apparatus, showed a great difference in the absolute concentration of Sa and So, but the same difference was not observed with the ratio. In the referred study the level of So in urine varied from 4.0 ± 0.4 ng mL⁻¹ to 39.9 ± 2.1 ng mL⁻¹ before and during the inflammation evolution, and Sa varied from 1.2 ± 0.15 ng mL⁻¹ to 21.4 ± 1.1 ng mL⁻¹, however the ratio remained roughly the same before and during the inflammatory process, 0.3 ± 0.01 and 0.54 ± 0.01 . Castegnaro *et al.* (1996) did a longitudinal study of seven female volunteers, with monthly sampling, over a 3-month period in which the overall Sa/So ratios varied, in average, tenfold (0.04–0.37). For one of the volunteers, a six fold variation was observed (0.37, 0.06 and 0.28, respectively).

Our results are in accordance with other studies, namely those conducted in urine by Castegnaro *et al.* (1996), Solfrizzo *et al.* (1997; 2004), Westhuizen *et al.* (1999); Qui and Liu (2001), and Ribar *et al.* (2001) (Table V.4).

Table V.4 Sa/So ratio obtained in our study as well as in different studies accomplished in urine samples from humans.

Region	Urine			Reference
	Sa (ng mL ⁻¹)	So (ng mL ⁻¹)	Sa/So	
Portugal				The present study
Urban population (n=38)	1.27±3.39 (0.18–17.48)	3.03±6.67 (0.07–34.97)	0.42±0.17 (0.23–0.78)	
Rural population (n=30)	0.76±1.53 (0.19–7.37)	2.31±4.29 (0.07–22.23)	0.43±0.22 (0.11–0.95)	
South Africa				Westhuizen <i>et al.</i> , 1999
Transkei	1.55±2.33 (n=153)	6.38±8.78 (n=153)	0.41±0.72 (0.01–5.75)	
Kwazulu-Natal	–	–	–	
Kenya Bomet	0.46±0.59 (n=27)	2.05±2.23 (n=27)	0.34±0.20 (0.03–0.74)	
Italy (South)				Solfrizzo <i>et al.</i> , 1997
(healthy female donors; n=6)	(0.51–3.60)	(2.36–7.60)	0.29 (0.17–0.53)	
(healthy male donors; n=9)	n.d.	(0–1.58)	–	
China Henan				Qiu and Liu, 2001
(female donors)	0.40 (0.18–3.13) (n=15)	2.36 (1.29–13.58) (n=15)	0.20 (0.14–0.25) (n=15)	
(male donors)	0.067 (0.019–0.09) (n=13)	0.72 (0.075–3.07) (n=13)	0.11 (0.028–0.25) (n=13)	
Croatia				Ribar <i>et al.</i> , 2001
(female control group)	0.096±0.075 (0.021–0.20) (n=20)	0.77±0.48 (0.20–1.28) (n=20)	0.25±0.08 (0.16–0.46) (n=20)	
(male control group)	0.018±0.015 (0.006–0.06) (n=20)	0.14±0.087 (0.029–0.28) (n=20)	0.18±0.12 (0.04–0.49) (n=20)	
(EN female donors)	1.09±0.93 (0.06–3.49) (n=5)	0.096±0.075 (0.021–0.20) (n=5)	0.14±0.08 (0.03–0.25) (n=5)	
(EN male donors)	1.22±0.036 (0.20–0.27) (n=4)	0.22±0.12 (0.051–0.32) (n=4)	1.60±1.59 (0.62–3.95) (n=4)	
Italy (South) and Argentine (Centre) (n=66)			0.36±0.02	Solfrizzo <i>et al.</i> , 2004
Brazil (South) (n=81)			1.57±0.49	
Argentine (North) (n=42)			0.69±0.12	
France				Castegnaro <i>et al.</i> , 1996
(female donors; n=14)	0.4–7	0.9–17	0.04–0.6	
(male donors; n=7)	detected in one sample	LOD–2		

Castegnaro *et al.* (1996) analyzed urine samples obtained from 14 female and 7 male healthy volunteers from France, and verified normal levels of the Sa/So ratio in the urine of healthy individuals. For women, the urinary Sa/So ratio varied from 0.04 to 0.60, with a range of levels of 0.4–7 ng mL⁻¹ for Sa,

and 0.9-17 ng mL⁻¹ for So. For men, So levels ranged from the limit of detection to 2 ng mL⁻¹, Sa was detected in only 1 sample, when 50 mL of sample were used. As in the present study, it was concluded that relatively low ratios were consistently observed in human subjects.

Solfrizzo *et al.* (1997) found that the values for Sa, So, and Sa/So were higher in urine of the female than those of the male samples. In the present study this fact was also observed. These authors could not establish a value for the Sa/So ratio in the case of male urine samples because Sa could not be detected below the detection limit (0.1 ng mL⁻¹) of the methodology applied. The female samples analyzed by the above mentioned authors revealed levels of Sa ranging from 0.51 to 3.60 ng mL⁻¹, whereas So ranged from 2.36 to 7.60 ng mL⁻¹. As for the ratio it varied from 0.17 to 0.53.

In a study conducted in the Transkei region, South Africa, and in the Bomet district, western Kenya, by Westhuizen *et al.* (1999), it was verified that the Sa/So ratio in the urine of male and female volunteers consuming a staple diet of home-grown maize in Transkei, was 0.41±0.72 (n =153). In Kenya, the ratio was 0.34±0.20 (n= 27). Mean total fumonisin level in home-grown maize, randomly collected in Transkei from the same region where the human volunteers lived, was 580 ng/g (n= 40). In Kenya, only one out of seven samples was contaminated with 60 ng g⁻¹ FBs. Despite the differences in FBs exposure between these areas, no significant differences were found in the urinary Sa/So ratios between males and females within the regions nor between the different regions ($p > 0.05$).

As shown in Table V.3, in the present investigation any differences between the populations studied were found. Although no information on FBs exposure is available specifically for these subjects, a previous study done in the central zone of Portugal (see Sub-chapter III.4) showed that for maize, the contamination levels found were 329 µg kg⁻¹ for FB₁ and 131 µg kg⁻¹ for FB₂, which means an intake of 0.153 and 0.214 µg kg⁻¹ b.w. day⁻¹ for FB₁, and for the sum of FB₁ and FB₂, respectively. The fact that these populations, even the rural one, were certainly under exposure, accordingly to the limits established by the

European commission (EC N.°856/2005), low absorption, and rapid elimination of FBs from the body, explain the unaltered Sa/So ratios founded.

Nonetheless, in 2001, Qui and Liu published a study where 28 healthy adult volunteers (15 females and 13 males) from Henan, China consumed, for 1 month, a diet based on their homegrown corn. It was observed that all the homegrown corn samples contained FB₁ ranging from 0.08 to 41.1 mg kg⁻¹. Whereas in the females group FB₁ exposure of individuals for the period tested ranged between 0.4 and 457 mg kg⁻¹ b.w. day⁻¹, without no significant change in mean urinary Sa/So ratios over the period studied (0.2 before and 0.18 at the end), the individuals of the males group, with exposures ranging from 0.5 to 740 mg FB₁ kg⁻¹ b.w. day⁻¹, had their mean urinary ratio increased from 0.11 to 0.21. The results suggested that sphingolipid metabolism of humans could be affected by FB₁ intake, and that the urinary Sa/So ratio may be useful for evaluating FB₁ exposure when the contamination of FB₁ is high, being males more sensitive to FB₁ disruption of sphingolipid metabolism than females.

However, accordingly to Shephard *et al.* (2007), much of this increase could be ascribed to a single participant with a ratio value of 0.87, whereas the next highest ratio was 0.32, little different from the highest level of 0.25 at the start of the study period. In this way, although the high fumonisin exposure, these results suggest that urinary Sa/So values would not be a viable and sensitive biomarker at the above referred levels of exposure.

In 2001 it was assessed the possible role of FBs as causative agents for endemic nephropathy (EN), a chronic renal disease present as an endemic in Brodska Posavina, Croatia. Therefore, it has been determined the Sa/So ratio in healthy subjects and EN patients from the endemic area. The results obtained in urine, as well as in serum, also pointed to a sphingolipid metabolism impairment, which may have been induced by FBs or fumonisin-like mycotoxins. As statistically significant differences were recorded in the subjects not yet affected with EN, impairment in the metabolism of sphingolipids might be considered as an early indicator of EN (Ribar *et al.*, 2001).

More recently, studies on the urinary Sa/So ratio in Argentina, Brazil and Italy have been published (Solfrizzo *et al.*, 2004). Mean fumonisin intake of volunteers in the maize consuming regions of southern Brazil, and northern Argentina was $0.56 \text{ mg kg}^{-1} \text{ b.w. day}^{-1}$ and the mean urinary Sa/So ratio was 1.27, whereas in a control population of non-eaters of maize in southern Italy and central Argentina the mean Sa/So ratio was 0.36, significantly lower than the value in the maize consuming population. However, the mean ratio in northern Argentina was only 0.69, which was not significantly different from the control population, but was significantly lower than the value of 1.57 in the volunteers from southern Brazil, despite almost identical FBs exposures (0.57 mg kg^{-1} and $0.55 \text{ mg kg}^{-1} \text{ b.w. day}^{-1}$ in southern Brazil, and in northern Argentina, respectively). It was thus concluded that the high Sa/So ratios observed in southern Brazil were not the result of FBs exposure, but of other unknown confounding factors (Solfrizzo *et al.*, 2004; Shephard *et al.*, 2007).

Studies have also been conducted in other human biological samples such as in serum (Castegnaro *et al.*, 1998; Ribar *et al.*, 2001), and plasma (Westhuizen *et al.*, 1999).

The mean Sa/So ratio in serum from 9 healthy female volunteers from France was 0.43 (range 0.18-0.78), in eight male volunteers from France was 0.31 (range 0.11-0.57), in 13 South African female volunteers was 0.22 (range 0.09-0.44), and in patients with esophageal cancer was 0.23 (range 0.16-0.36). Therefore, although the small number of cancer patients (n=4), no significant difference was detected in the Sa/So ratio between the healthy South African control subjects and patients with esophageal cancer (Castegnaro *et al.*, 1998). As seen, these results are also in accordance with those obtained with the present study.

The previously referred study of Westhuizen *et al.* (1999) that investigated the Sa/So ratio as a possible biomarker for fumonisin exposure in humans in rural areas of Africa and Kenya was also conducted in plasma, and the results achieved were similar to those obtained for urine.

Finally, in China was conducted a prospective nested case-control study to examine the relationship between serum sphingolipids and EC. The authors also found that no significant association between Sa, So or the Sa/So ratio values in serum and EC incidence, using conditional and unconditional logistic regression models with adjustments for age, sex, tobacco use, and alcohol use (Abnet *et al.*, 2001).

Despite the advances in analytical methods to determine Sa and So, some issues must be assessed. The ratio must be study at individual level for which the fumonisin exposure is determined, and may only be useful in populations when FBs exposure is very high, near or above the TDI established.

V.5. CONCLUSIONS

The use of NDA as derivatisation reagent allowed good separation and linearity. Oasis clean-up and LC-FD quantification with precolumn derivatisation, never used in the determination of Sa/So ratio in urine, allowed good recoveries, however the low volume of urine used did not permit the low detection limits required for this determination. Therefore, an attempt using liquid-liquid extraction of exfoliated urine cells with ethyl acetate was investigated, providing good results in terms of accuracy, repeatability, and sensitivity.

The application of the procedure to 68 samples from an urban and a rural population from the central zone of Portugal has demonstrated that, regarding the rural population, So presented a frequency of detection higher than Sa, 76.7% vs 40%. The Sa/So ratio was in the range of 0.19-0.95 and 0.11-0.40, for females and males, respectively, with means of 0.48 ± 0.22 for females, and 0.30 ± 0.16 for males. Concerning the urban population, Sa had a total frequency of detection of 36.8%, and So 81.6%. Sa/So ratio was in the range of 0.23-0.78 for females, and was 0.29 in the only male sample where was possible to establish it, with mean of 0.44 ± 0.18 for females.

CONCLUSÕES GERAIS

1. As metodologias analíticas optimizadas, especialmente no que concerne à derivatização, e os equipamentos de cromatografia líquida usados, acoplados a detectores de fluorescência e de massa, permitiram detecção e quantificação simultânea, sensível, exacta e precisa da FB_1 e da FB_2 em milho e alimentos derivados e permitiram também limites de quantificação e de detecção reduzidos e abaixo dos limites máximos estabelecidos pela Comissão Europeia.

2. Do estudo comparativo realizado entre os três detectores FD, MS, e MS-MS, usados na determinação de FBs em amostras de milho e produtos derivados do mesmo, concluiu-se que todos apresentam uma resposta adequada. No entanto, a aplicação da espectrometria de massa evita o processo de derivatização, permitindo uma análise mais rápida e menos complexa no que respeita a interferentes e repetição de injeções. A espectrometria de massa em *tandem* (MS-MS) possibilita melhor sensibilidade e selectividade na quantificação do analito, uma vez que a aquisição de pelo menos duas transições conseguidas com o triplo quadrupolo permite uma identificação unívoca e inequívoca.

3. De entre as matrizes de milho e produtos derivados adquiridas na zona Centro de Portugal, verificou-se que todas, exceptuando as amostras de amostras de amido de milho, cornflakes e cereais mistos, se apresentaram positivas para o total de FB_1+FB_2 , com uma frequência de contaminação de 22,4% e com níveis médios de contaminação que oscilaram entre 16 and 995 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No que respeita à matriz broa, observou-se uma frequência de contaminação de 83%, com uma média de contaminação de 274 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a soma de FB_1 e de FB_2 . A contaminação de FB_1 foi superior à de FB_2 . Uma amostra de

farinha de milho apresentou níveis de contaminação para a soma de FB_1 e de FB_2 acima do limite máximo actualmente estabelecido pela Comissão Europeia.

4. De entre as 41 amostras de produtos derivados de milho, comercialmente adquiridas em Valência, Espanha, incluindo amostras orgânicas e convencionais, apenas 17% se encontravam contaminadas com níveis que variaram entre n.d. e $922 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a FB_1 e n.d. e 640 para a FB_2 . A ocorrência e os níveis de contaminação de FB_1 e de FB_2 nos alimentos convencionais foram inferiores à dos alimentos orgânicos. A contaminação de FB_1 também foi superior à de FB_2 . De acordo com a legislação Europeia em vigor, apenas uma amostra de farinha de milho excedeu os limites estabelecidos.

5. Através da avaliação dos níveis de FB_1 e FB_2 em milho e alimentos derivados adquiridos na zona Centro de Portugal e na região de Valência, Espanha, e com base em tabelas de consumo, verificou-se que a exposição das respectivas populações é inferior à TDI estabelecida pela Comissão Europeia. Assim, apesar de algumas amostras apresentarem níveis de contaminação preocupantes, aparentemente, a contaminação de FBs nas amostras estudadas não produz risco para a população portuguesa e espanhola.

6. Da optimização do procedimento analítico para a determinação de FB_1 e de FB_2 em urina humana conclui-se que a purificação com IAC e detecção e quantificação por LC-FD após derivatização pré-coluna não permite uma adequada separação da FB_1 dos interferentes da matriz, conduzindo a baixas recuperações para esta fumonisina. A derivatização pós-coluna, apesar de nunca antes ter sido aplicada à determinação de FBs em urina, permitiu boas recuperações, no entanto, é essencial um melhor conhecimento dos processos analíticos envolvidos para o desenvolvimento de procedimentos mais seguros e precisos. A aplicação de LC-ESI-MS-MS, após purificação de amostras de urina com IAC, permitiu bons resultados no que respeita a sensibilidade, exac-

tidão e precisão aquando da sua aplicação na determinação simultânea de FB_1 e de FB_2 .

7. Da avaliação de FB_1 e de FB_2 em amostras de urina, de duas populações, uma rural, da vila de Pereira, e outra urbana, da cidade de Coimbra, ambas da zona Centro de Portugal, verificou-se que todas as amostras se apresentaram negativas. A sensibilidade da metodologia de análise otimizada, apesar de inferior aos métodos publicados na literatura científica, permite apenas a sua aplicação em casos em que se verifique uma exposição elevada.

8. A extracção líquido-líquido de células esfoliadas da urina com acetato de etilo permitiu resultados adequados no que respeita a sensibilidade, exactidão e precisão para a determinação de S_a , S_o e da razão S_a/S_o em amostras de urina.

9. A aplicação do procedimento às mesmas amostras de urina das populações anteriormente mencionadas demonstrou que a razão S_a/S_o não se encontrava alterada e que não se observaram diferenças significativas entre os dois grupos estudados.

10. São necessários esforços adicionais para prevenir a contaminação de milho e produtos derivados por FBs e assim minimizar a exposição humana tendo em vista a protecção da saúde pública. Apesar de em algumas sociedades a exposição ser baixa, a investigação e a implementação de medidas legislativas dirigidas às populações são necessárias para se diminuir a exposição das comunidades urbanas e rurais, especialmente as mais jovens, e daquelas em que se verifica uma dieta excessivamente rica em milho. Espera-se que, com o desenvolvimento científico, a espectrometria de massa se torne numa técnica menos onerosa e, em consequência, mais disponível para efectuar estes estudos, já que permite a análise directa de extractos, sem recurso à derivatização, e a respectiva confirmação.

GENERAL CONCLUSIONS

1. The optimization of analytical methodologies, especially concerning derivatisation procedures, and the use of liquid chromatographs coupled to fluorescence, and mass detectors, allowed the simultaneous, sensitive, accurate and precise detection and quantification of FB₁ and FB₂ in maize, and maize based foods, and also allowed reduced quantification limits under the maximum levels established by European Commission.

2. From the comparative study of the three LC detectors, FD, MS, and MS-MS, used in the analysis of FBs in maize and maize-based samples it was concluded that the response achieved by the three detectors was adequate. However, the application of mass spectrometry avoids the derivatisation process, allowing the analysis to be faster and less complex in terms of interferences and repeatability of injections. The two-stage mass spectrometry process (MS-MS) provides even higher sensitivity, and selectivity in analyte quantification, since the acquisition of at least two transitions achieved with triple quadrupole provides a univocal, and unequivocal identification.

3. From the maize and maize-based samples acquired in the Central Zone of Portugal FB₁ and FB₂ it was observed that all the commodities were positive for the sum of FB₁ and FB₂, with exception maize starch, cornflakes and mixed cereals. The contamination frequency was 22,4% and the mean contamination levels were between 16 and 995 µg kg⁻¹. Concerning, *broa*, the contamination frequency was 83%, and a mean contamination of FB₁ and FB₂ of 274 µg kg⁻¹. FB₁ was present in higher levels than FB₂. Accordingly to the actual European legislation, only one flour sample exceeded the limits established.

4. From the 41 samples of maize-based products from Spanish market acquired in the city of Valencia, including conventional and organic foods, only

17% of the samples were contaminated, in levels that oscillated between n.d. and 922 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for FB_1 , and between n.d. and 640 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for FB_2 . The frequency and contamination level of FB_1 and FB_2 in non organic foods was lower than in organic foods. One maize flour sample was above the maximum established limit.

5. Through the evaluation of FB_1 and FB_2 levels in maize and derived foods collected in the Central zone of Portugal, and in the region of Valencia, Spain, and based in consumption tables, it was concluded that the populations exposure was above the TDI established by European Commission, seeming that FBs contamination in the studied samples does not present a hazard to Portuguese and Spanish populations.

6. After the optimization of the analytical procedures for the determination of FB_1 and FB_2 in human urine, it has been concluded that IAC clean-up and LC-FD quantification after precolumn derivatisation does not allow an adequate separation of FB_1 from interferences of the urine. Postcolumn derivatisation, although never used in the determination of FBs in urine, allowed good recoveries. However better knowledge of the involved chemical processes is essential for development of more reliable and reproducible procedures. The application of the optimized LC-ESI-MS-MS methodology to urine samples, after sample clean-up through IAC, allowed adequate sensitivity, accuracy, and precision, when FB_1 and FB_2 were simultaneously determined.

7. From the evaluation of FB_1 and FB_2 in urine samples from two populations, one rural, from village of Pereira, and one urban, from the city of Coimbra, it was concluded that no detectable levels of FBs were found in the studied samples. The sensitivity of the optimized methodology, although better than that referred in published literature, means that it can only be applied when a high exposure is observed.

8. The liquid-liquid extraction of exfoliated urine cells with ethyl acetate provided good results in terms of sensitivity, accuracy, and precision.

9. The application of the procedure to the samples from same urban and rural populations demonstrated that the Sa/So ratio was not altered and no significant differences were found between the two studied groups.

10. Additional efforts are required to prevent contamination of maize and maize-based foods by FBs in order to minimize human exposure and preserve public health. Although in some societies the exposure degree is low, the investigation and implementation of legislation focussed in the populations are necessary to decrease the exposure of rural and urban populations, especially the youngest, and those whose diet is excessively based in maize. It is desirable that, with the scientific development, mass spectrometry becomes less expensive and consequently more available to use in these studies, since the direct analysis of the extracts, without derivatisation, facilitates the determination and respective confirmation.

BIBLIOGRAFIA

- ABBAS H. K., CARTWRIGHT R. D., XIE W., SHIERD W. T. (2006). Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Protection*, 25, 1–9.
- ABNET C. C., BORKOWF C. B., QIAO Y. -L., ALBERT P. S., WANG E., MERRIL A. H., MARK S. D., DONG Z. -W., TAYLOR P. R., DAWSEY S. M. (2001). Sphingolipids as biomarkers of fumonisin exposure and risk of esophageal squamous cell carcinoma in China. *Cancer Causes and Control*, 12, 821-828.
- ABOUZIED M. M., PESTKA J. J. (1994). Simultaneous screening of fumonisin B₁, aflatoxin B₁, and zearalenone by line immunoblot: a computer-assisted multianalyte assay system. *Journal AOAC International*, 77, 495.
- ACUÑA A., LOZANO M. C., GARCÍA M. C., DIAZ G. J. (2005). Prevalence of *Fusarium* species of the *Liseola* section on selected Colombian animal feedstuffs and their ability to produce fumonisins. *Mycopathologia*, 160, 63-66.
- AKIYAMA H., URAROONGROJ M., MIYAHARA M., GODA Y., TOYODA M. (1998). Quantitation of fumonisins in corn by HPLC with o-phthalaldehyde postcolumn derivatization and their identification by LC/MS. *Mycopathologia*, 140, 157-161.
- ALY S. E., ABDEL-GALIL M., ABDEL-WAHHAB M. A. (2004). Application of adsorbent agents technology in the removal of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ from malt extract. *Food Chem. Toxicol.*, 42, 1825-1831.
- AMRA H. A., ENEIN A. A., RAGAB A. A., AYESH A. M., MOHAMED M. I. (2003). Effect of tortilla processing on fumonisin B₁ destruction. *Toxicology Letters*, 144, Supplement 1, s62.
- ANGELIS DE I., FRIGGE G., RAIMONDI F., STAMMATI A., ZUCCO F., CALONI F. (2005). Absorption of fumonisin B₁ and aminopentol on an in vitro model of intestinal epithelium; the role of P-glycoprotein. *Toxicon*, 45, 285-291.
- ARIÑO A., ESTOPAÑAN G., JUAN T., HERRERA, A. (2007a). Estimation of dietary intakes of fumonisins B₁ and B₂ from conventional and organic corn. *Food Control*, 8, 1058-1065.

- ARIÑO A., JUAN T., ESTOPAÑAN G., GONZÁLEZ-CABO J. F. (2007b). Natural occurrence of *Fusarium* species, fumonisin production by toxigenic strains, and concentrations of fumonisins B₁ and B₂ in conventional and organic maize grown in Spain. *Journal of Food Protection*, 70, 151-156.
- ARRANZ I., BAEYENS W. R. G., VAN DER WEKEN G., DE SAEGER S., VAN PETEGHEM C. (2004). Review: HPLC determination of fumonisin mycotoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 195-203.
- AVANTAGGIATO G., SOLFRIZZO M., VISCONTI A. (2005). Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 22, 379-388.
- AZCONA-OLIVEIRA J. I.; ABOUZIED M. M., PLATTNER R. D., PESTKA J. J. (1992). Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B₁, B₂, and B₃. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 531-534.
- AZIZ N. H., EL-FAR F. M., SHAHIN A. A. M., ROUSHY S. M. (2007). Control of *Fusarium* moulds and fumonisin B₁ in seeds by gamma-irradiation. *Food Control*, 18, 1337-1342.
- BACON C. W., BENNETT R. M., HINTON D. M., VOSS K. A. (1992). Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. *Plant Disease*, 76, 144-148.
- BACON C. W., HINTON D. M. (1996). Fusaric acid and pathogenic interactions of corn and non-corn isolates of *Fusarium moniliforme*, a nonobligate pathogene of corn. In: *Fumonisin in food; Advances in experimental medicine and biology v. 392*, Jackson, L. S. De Vries, J. W., Bullerman, L. B., Eds; Plenum Press; New York, N.Y.; pp. 1-18.
- BACON C. W., YATES I. E., HINTON D. M., MEREDITH, F. (2001). Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives*, 109 (suppl. 2), 325-332.
- BANKOLE S. A., MABEKOJE O. O. (2004). Occurrence of aflatoxins and fumonisins in preharvest maize from south-western Nigeria. *Food Additives and Contaminants*, 21, 251-255.
- BATA A., LÁSZTITY R. (1999). Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 223-228.

- BEEKRUM S., GOVINDEN R., PADAYACHEE, ODHAV B. (2003). Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B₁. *Food Additives and Contaminants*, 20, 490-493.
- BEG M. U., AL-MUTAIRI M., BEG K. R., AL-MAZEEDI H. M., ALI L. N., SAEED, T. (2006). Mycotoxins in poultry feed in Kuwait. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 594-602.
- BENNETT G. A., RICHARD J. L. (1994). LC method for analysis of the NDA derivative of FBs. *Journal of AOAC International*, 77, 501-506.
- BEZUIDENHOUT G. C., GELDERBLOM W. C. A., GORST-ALLMAN C. P., HORAK R. M., MARASAS W. F. O., SPITELLER G., VLEGGAR R. F. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 11, 743-745.
- BITTENCOURT A. B. F., OLIVEIRA C. A. F., DILKIN P., CORRÊA B. (2005). Mycotoxin occurrence in maize meal and flour traded in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 16, 117-120.
- BOLGER M., COKER R. D., DINNOVI M., GAYLOR D., GELDERBLOM W., OLSEN M., PASTER N., RILEY R. T., SHEPHARD G., SPEIJERS G. J. A. (2001). WHO Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74; prepared by the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA); WHO: Geneva, Switzerland, pp 103-279, Available at <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm#6.0>. Accessed October 2005.
- BROGGI L. E., RESNIK S.L., PACIN A. M., GONZÁLEZ H. H. L., CANO G., TAGLIERI D. (2002). Distribution of fumonisins in dry milled corn fractions in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 19, 465-469.
- BUIM M. R., BRACARENSE A. P. F. R. L., GUIMARÃES I. G., KAWAMURA O., UENO Y., HIROOKA E. Y. (1999). Immunohistochemistry of fumonisin in poultry using avidin-biotin-peroxidase system. *Natural Toxins*, 7, 279-282.
- BULLERMAN L. B., BIANCHINI A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 140-146.
- BUTTER J. J., KOOPMANS R. P., MICHEL M. C. (2005). A rapid and validated method to quantify sphingosine 1-phosphate in human plasma using solid-phase extraction followed derivatization with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 824, 65-70.

- CAI Q., TANG L., WANG J. -S. (2007). Validation of fumonisin biomarkers in F344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225, 28-39.
- CARRATÙ M. R., CASSANO T., COLUCCIA A., BORRACCI P., CUOMO V. (2003). Antinutritional effects of fumonisin B₁ and pathophysiological consequences. *Toxicology Letters*, 140-141, 459-463.
- CARREIRA R. L., ORNELLAS C. B. D., MORAIS H. A., MOTTA S., SILVESTRE M. P. C. (2003). Efeito da precipitação pelo ácido tricloroacético (TCA) e da ultrafiltração sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína. *Ciência e Agrotecnologia*, 27, 414-419.
- CASTEGNARO M., GARREN L., GALENDO D., GELDERBLOM W. C. A., CHEDULE P., DUTTON M. F., WILD C. P. (1998). Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *Journal of Chromatography B*, 720, 15-24.
- CASTEGNARO M., GARREN L., GAUCHER I., WILD C. P. (1996). Development of a new method for the analysis of sphinganine and sphingosine in urine and tissues. *Natural Toxins*, 4, 284-290.
- CASTEGNARO M., TOZLOVANU M., SYLLA C. A., LESZKOWICZ A. P. (2006). Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 480 -487.
- CASTELLÁ G., BRAGULAT M. R., CABAÑES F. J. (1999). Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 4707-4710.
- CASTELLS M., MARÍN S., SANCHIS V., RAMOS J. (2005). Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: A review. *Food Additives and Contaminants*, 22, 150-157.
- CASTRO F. L. F., AQUINO S., GREINER R., RIBEIRO D. H. B., REISA T. A., CORREIA B. (2007). Effects of gamma radiation on maize samples contaminated with *Fusarium verticillioides*. *Applied Radiation and Isotopes*, 65, 927-933.
- CASTRO M. F. P. M., SHEPHARD G. S., SEWRAM V., VICENTE E., MENDONÇA T. A., JORDAN A. C. (2004). Fumonisins in Brazilian corn-based foods for human consumption. *Food Additives and Contaminants*, 21, 693-699.
- CAVAGLIERI L., ORLANDO J., RODRÍGUEZ M. I., CHULZE S., ETCHEVERRY M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156, 748-754.

- CAVALIERE C., FOGLIA P., PASTORINI E., SAMPERI R., LAGANA A. (2005). Development of a multiresidue method for analysis of major *Fusarium* mycotoxins in corn meal using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 2085-2093.
- CAWOOD M. E., GELDERBLOM W. C. A., VLEGGAAR R., BEHREND Y., THIEL P. G., MARASAS W. F. O. (1990). Isolation of the fumonisin mycotoxins: A quantitative approach. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39, 1958.
- CHARMLEY L. L., ROSENBERG A., TRENHOLM H. L. (1994). Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grain, foods and feedstuffs. in: *Mycotoxins in Grains*. Miller J.D., Trenholm H. L. (eds). St. Paul, MN: Eagan Press. p471.
- CHELULE P. K., GQALENI N., CHUTURGOON A. A., DUTTON M. F. (2000). The determination of fumonisin B₁ in faeces: a short term marker for assessment of exposure. *Biomarkers*, 5, 1-8.
- CHO Y. -H., YOO H. -S., MIN J. -K., LEE E. -Y., HONG S. -P., CHUNG Y. -B., LEE Y. -M. (2002). Comparative study of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and o-phthalaldehyde fluorogenic reagents for chromatographic detection of sphingoid bases. *Journal of Chromatography A*, 977, 69-76.
- CHU F. S., LI G. Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin 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*, 60, 847-852.
- CIRILLO T., RITIENI A., GALVANO F., COCCHIERI R. A. (2003a). Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂ in Italian marketed foodstuffs. *Food Additives and Contaminants* 20, 566-571.
- CIRILLO T., RITIENI A., VISONE M., COCCHIERI R. A. (2003b). Evaluation of conventional and organic italian foodstuffs for deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51, 8128-8131.
- COMMISSION DECISION 2002/657/EC of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC, Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results. *Official Journal of European Union*, L221/8-L221/36.
- 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 European Union*, L143/18-L143/26.

- COMMISSION RECOMMENDATION 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2, HT-2, and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of European Union*, L229/7-L229/9.
- COMMISSION RECOMMENDATION 2006/583/EC of 17 August 2006 on the prevention and reduction of Fusarium toxins in cereals and cereal products. *Official Journal of European Union*, L234/35-L234/40.
- COMMISSION REGULATION (EC) N° 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of European Union*, L 364/5- L 364/24.
- 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 to *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of European Union*, L 255/14-L255/17.
- COMMISSION REGULATION (EC) N°401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of European Union*, L 70/12-L70/34.
- COMMISSION REGULATION (EC) N°856/2005 of 6 June 2005 amending Regulation (EC) N°466/2001 as regards *Fusarium* toxins. *Official Journal of European Union*, L 143/3-L143/8.
- CORTEZ-ROCHA M. O., RAMÍREZ-ASTUDILLO W. R., SÁNCHEZ-MARIÑEZ R. I., ROSAS-BURGOS E. C., WONG-CORRAL F. J., BORBOA-FLORES J., CASTILLÓN-CAMPAÑA L. G., TEQUIDA-MENESES M. (2003). Fumonisins and fungal species in corn from Sonora, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 668-673.
- CREPPY E. E., CHIARAPPA P., BAUDRIMONT I., BORRACCI P., MOUKHA S., CARRATÚ M. R. (2004). Synergistic effects of fumonisin B₁ and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? *Toxicology*, 201, 115-123.
- CREWS H., ALINK G., ANDERSEN R., BRAESCO V., HOLST B., MAIANI G., OVESEN L., SCOTTER M., SOLFRIZZO M., BERG R. VAN DEN, VERHAGEN H., WILLIAMSON G. (2001). A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. *British Journal of Nutrition*, 86, suppl. 1, s5-s35.
- D'MELLO J. P. F., MACDONALD A. M. C. (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166.

- DE LA CAMPA R., MILLER J. D., HENDRICKS K. (2004). Fumonisin in tortillas produced in small-scale facilities and effect of traditional masa production methods on this mycotoxin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 4432-4437.
- DE NIJS M., SIZOO E. A., VERMUNT A. E., NOTERMANS S. H., VAN EGMOND H. P. (1998). The occurrence of fumonisin B₁ in maize containing foods in The Netherlands. *Food Additives and Contaminants*, 15, 385–388.
- DELONGCHAMP R. R., YOUNG J. F. (2001). Tissue sphinganine as a biomarker of fumonisin-induced apoptosis. *Food Additives and Contaminants*, 18, 255-1261.
- DESAI K., SULLARDS M. C., ALLEGOOD J., WANG E., SCHMELZ E. M., HARTL M., HUMPF H. -U., LIOTTA D. C., PENG Q., MERRILL JR A. H. (2002) Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1585, 188-192.
- DESJARDINS A. E., MANANDHAR G., PLATTNER R. D., MARAGOS C. M., SHRESTHA K., MCCORMICK S. P. (2000). Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing on mycotoxin levels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 1377-1383.
- DIÁRIO DA REPÚBLICA – I SÉRIE A- N.º 44, 2 de Março de 2006, Decreto Lei N.º50/2006 de 2 de Março.
- DIRECTORATE-GENERAL HEALTH AND CONSUMER PROTECTION. (2003). Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Reports on tasks for scientific cooperation, 1-606.
- DOKO M. B., RAPIOR S., VISCONTI A., SCHJØTH J. E. (1995). Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 429-434.
- DOKO M. B., VISCONTI A. (1994). Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Additives and Contaminants*, 11, 433-439.
- DOMBRINK-KURTZMAN M. A., DVORAK T. J. (1999). Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 622-627.
- DOMBRINK-KURTZMAN M. A., DVORAK T. J., BARRON M. E., ROONEY L. Y. (2000). Effect of nixtamalization (alkaline cooking) on fumonisin-contaminated corn for production of masa and tortillas. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 5781-5786.

- DOMIJAN A. -M., PERAICA M., FUCHS R., LUCIĆ A., RADIĆ B., JURJEVIĆ •., CVJETKOVIĆ B. (2003). Screening for fumonisins B₁ and B₂ in corn collected in Republic of Croatia. *Toxicology Letters*, 144 (suppl.1), s64.
- DOMIJAN A. -M., PERAICA M., JURJEVIĆ •., IVIĆ D., CVJETKOVIĆ B. (2005). Fumonisin B₁, fumonisin B₂, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. *Food Additives and Contaminants*, 22, 677-680.
- DOMIJAN A. -M., ZELJEZIC D., MILIC M., PERAICA M. (2007). Fumonisin B₁: Oxidative status and DNA damage in rats. *Toxicology*, 232, 163–169.
- DUNCAN K., KRUGER S., ZABE N., KOHN B., PRIOLI R. (1998). Improved fluorometric and chromatographic methods for the quantification of fumonisins B₁, B₂ and B₃. *Journal of Chromatography A*, 815, 41-47.
- DUVICK J. (2001). Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environmental Health Perspectives*, 109 (suppl. 2), 337-342.
- ELSENHANS B., BLUME R., LEMBCKE B., CASPARY W. F. (1983). Polycations: a new class of inhibitors for in vitro small intestinal transport of sugars and aminoacids in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 727, 135-143.
- EMAN (2000). European Mycotoxin Awareness Network. Available at <http://www.mycotoxins.org>. Accessed on April 2004.
- EMAN, Basic Sheet 5 Fumonisins – <http://193.132.193.215/eman2/fsheet5.asp>. Accessed on 19.10.2005.
- FABERI A., FOGLIA P., PASTORINI E., SAMPERI R., LAGANA A. (2005). Determination of type B fumonisin mycotoxins in maize and maize-based products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a QqQlinear ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 275-282.
- FANDOHAN P., ZOUMENOU D., HOUNHOUGAN D. J., MARASAS W. F. O., WINGFIELD M. J., HELL K. (2005). Fate of aflatoxins and fumonisins during the processing of maize into food products in Benin. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 249-259.
- FAO (2003). Available at http://nue.okstate.edu/Crop_Information/World_Wheat_Production.htm. Accessed on 16.06.2005.
- FAO/WHO (2001). Fifty-sixth meeting, Geneva, Summary and conclusions. Available at <http://www.who.int/pcs/jecfa/summary56.pdf>. Accessed on 14.09.2003.

- FAZEKAS B., –TAR A. K.,–HAJDU E. T.,–KOVÁCS M. Z. (1999). Reusability of IAC columns for the determination of fumonisins in maize. *Natural Toxins*, 7, 259-263.
- FODOR J., MEYER K., GOTTSCHALK C., MAMET R., KAMETLER L., BAUER J., HORN P., KOVACS F., KOVACS, M. (2007). In vitro microbial metabolism of fumonisins B₁. *Food Additives and Contaminants*, 24, 416-420.
- FODOR J., MEYER K., RIEDLBERGER M, BAUER J, HORN P, KOVACS F, KOVACS M. (2006). Distribution and elimination of fumonisin analogues in weaned piglets after oral administration of *Fusarium verticillioides* fungal culture. *Food Additives and Contaminants*, 23, 492-501.
- FUMONISINS (JECFA, 2001). Available at <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm#6.0>. Accessed on 20.10.2005.
- FUMONISINS PAGE. Available at <http://www.ansci.cornell.edu/courses/as625/1997term/Park>. Accessed on 12.09.2003.
- FUMONISINS. Available at <http://micotoxinas.com.br/fumofacts.htm>. Accessed on 13.09.2003.
- GARREN L., GALENDO D., WILD C. P., CASTEGNARO M. (2001). The induction and persistence of altered sphingolipid biosynthesis in rats treated with FB₁. *Food Additives and Contaminants*, 18, 850-856.
- GELDERBLOM W. C. A., JASKIEWICZ K., MARASAS W. F. O., THIEL P. G., HORAK R. M., VLEGGAAR R., KRIEK P. J. (1988). Fumonisins – novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1806-1811.
- GELDERBLOM W. C. A., SEIER J. V., SNIJMAN P. W., SCHALKWYK D. J., SHEPHARD G. S., MARASAS W. F. O. (2001). Toxicity of culture material of *Fusarium verticillioides* strain MRC 826 to nonhuman primates. *Environmental Health Perspectives*, 109 (suppl. 2), 267-276.
- GIROLAMO A. SOLFRIZZO M., HOLST C., VISCONTI A. (2001). Comparison of different extraction and clean-up procedures for the determination of fumonisins in maize and maizebased food products. *Food Additives and Contaminants*, 18, 59-67.
- GROTEN J. P., TAJIMA O., FERON V. J., SCHOEN E. D. (1998). Statistically designed experiments to screen mixtures chemical mixtures for possible interactions. *Environmental Health Perspectives*, 106 (suppl. 6), 1361-1365.

- GUTEMA T., MUNIMBAZI C., BULLERMAN L. B. (2000). Occurrence of fumonisins and moniliformin in corn and corn-based food products of U.S. origin. *Journal of Food Protection*, 63, 1732-1737.
- HE Q., RILEY R. T., SHARMA R. P. (2005). Myriocin prevents fumonisin B₁-induced sphingoid base accumulation in mice liver without ameliorating hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 969-979.
- HERRÁEZ-HERNANDEZ R., CAMPÍNS-FALCÓ P. (2000). Derivatization techniques for automated chromatographic analysis of amphetamine using o-phthaldialdehyde: a comparative study. *Chromatographia*, 52, 169-174.
- HOPMANS E. C., MURPHY P. A. (1993). Detection of fumonisins B₁, B₂, and B₃ and hydrolysed fumonisin B₁ in corn-containing foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 1655-1658.
- HOPMANS H. C., HAUCK C. C., HENDRICH S., MURPHY P. A. (1997). Excretion of fumonisin B₁-fructose adduct in rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 2618-2625.
- <http://faostat.fao.org/site/33a/default.aspx>. Accessed on 20.02.2008.
- <http://www.ars.usda.gov/is/pr/2006/061005.htm>. Accessed on 11.09.2007.
- <http://www.gastronomias.com>. Accessed on 8.11.2005.
- <http://www.initaly.com>. Accessed on 16.01.2006.
- <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/lcb/index.htm>. Accessed on 11.09.2007.
- <http://www.touchbriefings.com/pdf/1133/pickering.pdf>. Accessed on 20.02.2007.
- IARC (International Agency For Research On Cancer) (2002). *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Volume 82: 301-366. *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. IARC, Lyon France.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (2004). Available at www.ine.pt. Accessed on June 2005.
- INSTITUTO PORTUGUÊS DO CONSUMIDOR (2005). Available at http://www.consumidor.pt/loja_novo/includes/content/pao_inf_comp.inc. Accessed on 8.11.2005.
- ISAACSON C. (2005). The change of the staple diet of black South Africans from sorghum to maize (corn) is the cause of the epidemic of squamous carcinoma of the oesophagus. *Medical Hypothesis*, 64, 658-660.

- JACKSON L. S., HLYWKA J. J., SENTHIL K. R., BULLERMAN L. B. (1996a). Effects of thermal processing on the stability of fumonisin B₂ in an aqueous system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1984-1987.
- JACKSON L. S., HLYWKA J. J., SENTHIL K. R., BULLERMAN L. B., MUSSEY S. M. (1996b). Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B₁ in an aqueous model system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 906-912.
- JACKSON L.S., KATTA S.K., FINGERHUT D.D., DEVRIES J.W., BULLERMAN L.B. (1997). Effects of baking and frying on the fumonisin B₁ content of maize-based foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 4800-4805.
- JINDAL N., MAHIPAL S. K., ROTTINGHANS G. E. (1999). Occurrence of FB₁ in maize and poultry feeds in Haryana, India. *Mycopathologia*, 148, 37-40.
- JURGENSON J. E., ZELLER K. A., LESLIE J. F. (2002). Expanded genetic map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1972-1979.
- KEDERA C. J., PLATTNER R. D., DESJARDIN A. E. (1999). Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B₁ in maize in western Kenya. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 41-44.
- KIM E. -K., SCOTT P. M., LAU B. P. -Y. (2003). Hidden fumonisin in corn-flakes. *Food Additives and Contaminants*, 20, 161-169.
- KUBENA L. F., EDRINGTON T. S., HARVEY R. B., PHILLIPS T. D., SARR A. B., ROTTINGHAUS G. E. (1997). Individual and combined effects of fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and diacetoxyscirpenol or ochratoxin A in turkey poult. *Poultry Science*, 76, 256-264.
- LABUDA R., TANÈINOVA D., HUDEC K. (2003). Identification and enumeration of *Fusarium* species in poultry feed mixtures from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10, 61-66.
- LERDA D., BISTONI B. M., PERALTA N., YCHARI S., VAZQUEZ M., BOSIO G. (2005). Fumonisin in foods from Córdoba (Argentina), presence and genotoxicity. *Food and Chem Toxicology*, 43, 691-698.
- LINO C. M., SILVA L. J. G., PENNA A. S., SILVEIRA M. I. (2006). Determination of fumonisins B₁ and B₂ in Portuguese maize and maize-based samples by HPLC with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 1214-1220.

- LOISEAU N., DEBRAUWER L., SAMBOU T., BOUHET S., MILLER J. D., MARTIN P. G., VIADERE J. L., PINTON P., PUEL O., PINEAU T., TULLIEZ J., GALTIER P., OSWALD I. P. (2007). Fumonisin B₁ exposure and its selective effect on porcine jejunal segment: sphingolipids, glycolipids and trans-epithelial passage disturbance. *Biochemical Pharmacology*, 74, 144-52.
- LOMBAERT G. A., PELLAERS P., ROSCOE V., MANKOTIA M., NEIL R., SCOTT P. M. (2003). Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Additives and Contaminants*, 20, 494-504.
- MARAGOS C. M. (1995). CZE and HPLC for the analysis of fluorescein isothiocyanate-labeled FB₁. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 390-394.
- MARAGOS C. M., BENNETT G. A., RICHARD J. L. (1996). Analysis of fumonisin B₁ in corn by capillary electrophoresis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 392, 105-112.
- MARASAS W. F. O. (1996). Fumonisin: history, world-wide occurrence and impact. in *Fumonisin in food*; Advances in experimental medicine and biology v. 392, Jackson L.S., De Vries J.W., Bullerman L.B., Eds; Plenum Press; New York, N.Y.; pp. 1-18.
- MARASAS W. F. O., RILEY R. T., HENDRICKS K. A., STEVENS V. L., SADLER T. W. *et al.* (2004). Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *Journal of Nutrition*, 134, 711-716.
- MARTINS H. M., MARTINS M. L. (2001). Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal: 1996-1999). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 96, 85-88.
- MARTINS M. L., MARTINS H. M., BERNARDO F. (2001). Fumonisin B₁ and B₂ in black tea and medicinal plants. *Journal of Food Protection*, 64, 1268-1270.
- McKEAN C., TANG L., TANG M., BILLAM M., WANG Z., THEODORAKIS C. W., KENDALL R. J., WANG J. -S. (2006). Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in animals and human cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 868-876.
- MERRILL A. H. JR., NIMKAR S., MENALDINO D., HANNUN Y. A., LOOMIS C., BELL R. M., TYAGI S. R., LAMBETH J. D., STEVENS V. L., *et al.* (1989). Structural requirements for long-chain (sphingoid) base inhibition of protein kinase C in vitro and for the cellular effects of these compounds. *Biochemistry*, 28, 3138-3145.

- MEYER K., MOHR K., BAUER J., HORN P., KOVÁCS M. (2003). Residue formation of fumonisin B₁ in porcine tissues. *Food Additives and Contaminants*, 20, 639-647.
- MISSMER S. A., SUAREZ L., FELKNER M., WANG E., MERRILL A. H., ROTHMAN K. J., HENDRICKS K. A. (2006). Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. *Environmental Health Perspectives*, 114, 2, 237-241.
- MIYAHARA M., AKIYAMA H., TOYODA M., SAITO Y. (1996). New procedure for fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products by ion pair chromatography with o-phthalaldehyde postcolumn derivatisation and fluorometric detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 842-847.
- MOKOENA M. P., CHELULE P. K., GQALENI N. (2005). Reduction of fumonisin B₁ and zearalenone by lactic acid bacteria in fermented maize meal. *Journal of Food Protection*, 68, 2095-2099.
- MOLINIÉ A., FAUCET V., CASTEGNARO M., PFOHL-LESKOWICZ A. (2005). Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B₁: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry*, 92, 391-400.
- MOMANY F. A., DOMBRINK-KURTZMAN M. A. (2001). Molecular dynamics simulations on the mycotoxin fumonisin B₁. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 1056-1061.
- MÜLLER G., KIELSTEIN P., ROSNER H., BERNDT A., HELLER M., KOHLER H. (1999). Studies on the influence of combined administration of ochratoxin A, fumonisin B₁, deoxynivalenol and T2 toxin on immune defence reactions in weaner pigs. *Mycoses*, 42, 485-493.
- MUNKVOLD G. P., DESJARDIN A. E. (1997). Fumonisins in maize – Can we reduce their occurrence? *Plant Disease*, 81, 556-565.
- MUSSER S. M., PLATTNER R. D. (1997). Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygmi*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 1169-1173.
- NELSON P. E. (1991). Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, 117, 29-36.

- NELSON P. E., DESJARDIN A. E., PLATTNER R. D. (1993). Fumonisin mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 233-252.
- NOJIRI S., KAMATA K., NISHIJIMA M. Fluorescence detection of biotin using post-column derivatization with OPA in high performance liquid chromatography. (1998). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16, 1357-1362.
- OMURTAG G. Z., YAZICIOGLU D. (2004). Determination of Fumonisin B₁ and B₂ in herbal tea and medicinal plants in Turkey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Protection*, 67, 1782-1786.
- PAEPENS C., DE SAEGER S., VAN POUCKE C., DUMOULIN F., VAN CALENBERGH S., VAN PETEGHEM C. (2005). Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantification of fumonisin B₁, B₂ and B₃ in cornflakes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 2021-2029.
- PALENCIA E., TORRES O., HAGLER W., MEREDITH F. I., WILLIAMS L. D., RILEY R. T. (2003). Total fumonisins are reduced in tortillas using the traditional nixtamalization method of Mayan communities. *Journal of Nutrition*, 133, 3200-3203.
- PARK J. W., SCOTT P. M., LAU B. P. -Y., LEWIS D. A. (2004). Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins. *Food Additives and Contaminants*, 21, 1168-1178.
- PATEL S., HAZEL C. M., WINTERTON A. G., GLEADLE A. E. (1997). Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. *Food Additives and Contaminants*, 14, 187-191.
- PETERSEN A., THORUP I. (2001). Preliminary evaluation of fumonisins by the Nordic countries and occurrence of fumonisins (FB1 and FB2) in corn-based foods on the Danish market. *Food Additives and Contaminants*, 18, 221-226.
- PICCO M., NESCI A., BARROS G., CAVAGLIERI L., ETCHEVERRY M. (1999). Aflatoxin B₁ and FB₁ in mixed cultures of *Aspergillus flavus* and *Fusarium proliferatum* on maize. *Natural Toxins*, 7, 331-336.
- PIETRI A., BERTUZZI T., PALLARONI L., PIVA G. (2004). Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Additives and Contaminants*, 21, 479-487.

- PIÑEIRO M. S., SILVA G. E., SCOTT P. M., LAWRENCE G. A., STACK M. E. (1997). Fumonisin levels in Uruguayan corn products. *Journal of AOAC International*, 80, 825-828.
- PITTET A., PARISOD V., SCHELLENBERG M. (1992). Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in corn-based products from the Swiss market. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 1352-1354.
- PLATTNER R. D. (1999). HPLC/MS analysis of *Fusarium* mycotoxins, fumonisins and deoxynivalenol. *Natural Toxins*, 7, 365-370.
- PLATTNER R. D., NORRED W. P., BACON C. W., VOSS K. A., PETERSON R., SHACKELFORD D. D., WEISLEDER D. (1990). A method of detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Mycologia*, 82, 698-702.
- PLATTNER R. D., WEISLEDER D., SHACKELFORD D. D., PETERSON R., POWELL R. G. (1992). A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, 117, 23-28.
- POHLAND A. E. (1996). Occurrence of fumonisins in the U.S. food supply. *Advances in Experimental and Medicine Biology*, 392, 19-26.
- POLING S. M., PLATTNER R. D. (1999). Rapid purification of fumonisins and their hydrolysis products with solid-phase extraction columns. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 2344-2349.
- POZZI C. R., ARCARO J. R. P., JÚNIOR I. A., FAGUNDES H., CORRÊA B. (2002). Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. *Ciência Rural*, 32, 901-907.
- PRELUSKY D. B., MILLER J. D., TRENHOLM H. L. (1996). Disposition of ¹⁴C-derived residues in tissues of pigs fed radiolabelled fumonisin B₁. *Food Additives and Contaminants*, 13, 155-162.
- QIU M., LIU X. (2001) Determination of shinganine, sphingosine and Sa/So ratio in urine of humans exposed to dietary fumonisin B₁. *Food Additives and Contaminants*, 18, 263-269.
- RAMMOUZ G., LACROIX M., GARRIGUES J. C., POINSOT V., COUDERC F. (2007). The use of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde for the analysis of primary amines using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography*, 21, 1223-1239.

- RHEEDER J. P., MARASAS W. F. O., THIEL P. G., SYDENHAM E. W., SHEPHARD G. S., VAN SCHALKWYK D. J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn related to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82, 353-357.
- RIBAR S., MESARIÉ M., BAUMEN, M. (2001). High-performance liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine in serum and urine of subjects from an endemic nephropathy area in Croatia. *Journal of Chromatography B*, 754, 511-519.
- RILEY R. T., HINTON D. M., CHAMBERLAIN W. J., BACON C. W., WANG E., MERRILL A. H. JR., VOSS K. A. (1994a). Dietary fumonisin B₁ induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity. *Journal of Nutrition*, 124, 594-603.
- RILEY R. T., TORRES O. A., PALENCIA E. (2006). International shipping of fumonisins from maize extracts on C18 sorbent. *Food Additives and Contaminants*, 23, 826-832.
- RILEY R. T., WANG E., MERRILL A. H. (1994b). Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: use of the free sphinganine-to-sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 77, 533-540.
- ROSS P. F., NELSON P. E., RICHARD J. L., OSWEILER G. D., RICE L. G., PLATTNER R. D., WILSON T. M. (1990). Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associates with equine leucoencefalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3225-3226.
- ROSS P. F., WILSON T. M., OWENS D. L., NELSON H. A., RICHARD J. L. (1991). Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. *Mycopathologia*, 114, 129-135.
- ROYER D., HUMPF H. -U., GUY P. A. (2004). Quantitative analysis of *Fusarium* mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, 21, 678-692.
- SAMAPUNDO S., MEULENAER B. D., MUER N. D., DEBEVERE J., DEVLIEGHIERE F. (2006). Influence of experimental parameters on the fluorescence response and recovery of the high-performance liquid chromatography analysis of fumonisin B₁. *Journal of Chromatography A*, 1109, 312-316.

- SANCHIS V., ABADIAS M., ONCINS L., SALA N., VINAS I., CANELA R. (1994). Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Spanish market. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2147-2148.
- SAUNDERS D. S., MEREDITH F. I., VOSS K. A. (2001). Control of fumonisin: effects of processing. *Environmental Health Perspectives*, 109 (suppl 2), 333-336.
- SCHNEIDER E., USLEBER E., MÄRTLBAUER E. (1995). Rapid detection of FB₁ in corn-based food by competitive direct dipstick enzyme immunoassay with integrated negative control reaction *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 2548-2552.
- SCOTT P. M., LAWRENCE G. A. (1992). Liquid chromatography determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *Journal of AOAC International*, 75, 829-834.
- SCOTT P. M., LAWRENCE G. A. (1995). Analysis of beer for fumonisins. *Journal of Food Protection* 58, 1379-1382.
- SCUDAMORE K. A., NAWAZ S., HETMANSKI M. T. (1997). Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. *Food Additives and Contaminants*, 14, 175-186.
- SCUDAMORE K. A., NAWAZ S., HETMANSKI M. T. (1998). Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. *Food Additives and Contaminants*, 15, 30-55.
- SCUDAMORE K. A., PATEL S. (2000). Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food Additives and Contaminants*, 17, 407-416.
- SEEFELDER W., KNECHT A., HUMPT H. –U. (2003). Bound fumonisin B₁: analysis of fumonisin-B₁ glyco and amino acid conjugates by Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 5567-5573.
- SEEFELDER W., SCHWERDT G., FREUDINGER R., GLEKLE M., HUMPT H. –U. (2002). Liquid chromatography – electrospray ionization-mass spectrometry method for the quantification of sphingosine and sphinganine in cell cultures exposed to fumonisins. *Journal of Chromatography B*, 780, 137-144.

- SEO J. -A., LEE Y. -W. (1999). Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1331-1334.
- SEWRAM V., MSHICILELI N., SHEPHARD G. S., MARASAS W. F. O. (2003). Fumonisin mycotoxins in human hair. *Biomarkers* 8, 110-118.
- SEWRAM V., NAIR J. J., NIEUWOUTD T. W., GELDERBLOM W. C., MARASAS W. F. O., SHEPHARD G. S. (2001). Assessing chronic exposure to fumonisin mycotoxins: the use of hair as a suitable non invasive matrix. *Journal of Analytical Toxicology*, 25, 450-455.
- SHARMA N., HE Q., SHARMA R. P. (2004). Sphingosine kinase activity confers resistance to apoptosis by fumonisin B₁ in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Chemico-Biological Interactions*, 151, 33-42.
- SHEPHARD G. S., SYDENHAM E. W., THIEL P. G., GELDERBLOM W. C. A. (1990). *Journal of Liquid Chromatography*, 13, 2077-2087.
- SHEPHARD G. S. (1998). Chromatographic determination of the fumonisins mycotoxins. *Journal of Chromatografia A*, 815, 31-39.
- SHEPHARD G. S., MARASAS W. F. O., LEGGOTT N. L., YASDANPANAH H., RAHIMIAN H., SAFAVI N. (2000). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 1860-1864.
- SHEPHARD G. S., SEWRAM V. (2004). Determination of the mycotoxin fumonisin B₁ in maize by reversed-phase thin-layer chromatography: a collaborative study. *Food Additives and Contaminants*, 21, 498-505.
- SHEPHARD G. S., SNIJMAN P. W. (1999). Elimination and excretion of a single dose of a mycotoxin fumonisin B₂ in a non-human primate. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 111-116.
- SHEPHARD G. S., THIEL P. G., STOCKENSTRÖM S., SYDENHAM E. W. (1996a). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of AOAC International*, 79, 671-687.
- SHEPHARD G. S., THIEL P. G., SYDENHAM E. W. (1992a). Determination of fumonisin B₁ in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 574, 299-304.
- SHEPHARD G. S., THIEL P. G., SYDENHAM E. W. (1995a). Liquid chromatographic determination of the mycotoxin FB₂ in physiological samples. *Journal of Chromatography A*, 692, 39-42.

- SHEPHARD G. S., THIEL P. G., SYDENHAM E. W., ALBERTS J. F., CAWOOD M. E. (1994). Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxins fumonisins B₁ in a non-human primate. *Toxicon*, 32, 735-741.
- SHEPHARD G. S., THIEL P. G., SYDENHAM E. W., ALBERTS J. F., GELDERBLOM W. C. A. (1992b). Fate of a single dose of the ¹⁴C-labelled mycotoxin FB₁ in rats. *Toxicon*, 30, 768-770.
- SHEPHARD G. S., THIEL P. G., SYDENHAM E. W., SNIJMAN P. W. (1995b). Toxicokinetics of the mycotoxin FB₂ in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 591-595.
- SHEPHARD G. S., WESTHUIZEN L., SEWRAM V. (2007). Biomarkers of exposure to fumonisin mycotoxins: A review. *Food Additives and Contaminants*, 24, 1196-1201.
- SHEPHARD G. S., WESTHUIZEN L., THIEL P. G., GELDERBLOM W. C. A., MARASAS W. F. O., SCHALKWYK D. J. (1996 b). Disruption of sphingolipid metabolism in non-human primates consuming diets of fumonisin-containing *Fusarium moniliforme* culture material. *Toxicon*, 34, 527-534.
- SHEPHARD G. S., WESTHUIZEN L. J. (1998). LC determination of Sa/So ratio in serum. *Journal of Chromatography B*, 710, 219-222.
- SHETTY P. H., BHAT R. V. (1999). A physical method for segregation of fumonisin-contaminated maize. *Food Chemistry*, 66, 371-374.
- SHETTY P. H., BHAT R. V. (1998). Sensitive method for the detection of fumonisin B₁ in human urine. *Journal of Chromatography B*, 705, 171-173.
- SKOOG D. A., HOLLER F. J., NIEMAN T. A. In *Principles of Instrumental Analysis* 5th; Brace College Publishers; Hartcourt, Philadelphia, 1998, p.725.
- SOLFRIZZO M., AVANTAGGIATO G., VISCONTI A. (1997). Rapid method to determine sphinganine/ sphingosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure. *Journal of Chromatography B*, 692, 87-93.
- SOLFRIZZO M., CHULZE S. N., MALLMANN C., VISCONTI A., GIROLAMO A., ROJO F., TORRES A. (2004). Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. *Food Additives and Contaminants*, 21, 1090-1095.
- SOLFRIZZO M., GIROLAMO A., VISCONTI A. (2001). Determination of FB₁ and B₂ in corn-flakes by HPLC and IAC clean-up. *Food Additives and Contaminants*, 18, 227-235.

- SOLFRIZZO M., VISCONTI A., AVANTAGGIATO G., TORRES A., CHULZE S. (2000). In vitro and in vivo studies to assess the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins. *Mycopathologia*, 151,147–153.
- SORIANO J. M., DRAGACCI S. (2004). Intake, decontamination and legislation of fumonisins in foods. *Food Research International*, 37, 367-374.
- SORIANO J. M., GONZÁLEZ L., CATALÁ A. I. (2005). Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B₁. *Progress in Lipid Research*, 44, 345-356.
- SPEIJERS G. J. A., SPEIJERS M. H. M. (2004). Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153, 91-98.
- STACK M. E. (1998). Analysis of fumonisin B₁ and its hydrolysis product in tortillas. *Journal of AOAC International*, 81, 737-740.
- STROKA J., CAPELETTI C., PAPADOPOULOU-BOURAOUI A., PAYARON L., ANKLAM E. (2002). Investigation of alternative reagents to 2-mercaptoethanol for the pre-column derivatization of fumonisins with o-phthalaldehyde, for HPLC analysis. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 25, 1821-1833.
- SUN G., WANG S., HU X., SU J., HUANG T., YU J., TANG L., GAO W., WANG J. S. (2007). Fumonisin B₁ contamination of home-grown corn in high-risk areas for esophageal and liver cancer in China. *Food Additives and Contaminants*, 24, 181-185.
- SYDENHAM E. W., GELDERBLOM W. C. A., THIEL P. G., MARASAS W. F. O. (1990). Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 285-290.
- SYDENHAM E. W., SHEPHARD G. S., THIEL P. G. (1992a). Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in foods and feeds. *Journal of AOAC International*, 75, 313-318.
- SYDENHAM E. W., SHEPHARD G. S., THIEL P. G., MARASAS W. F. O., HIROOKA E. Y. (1992b). Fumonisins concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal micotoxicosis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 994-997.
- SYDENHAM E. W., SHEPHARD G. S., THIEL P. G., MARASAS W. F. O., RHEEDER J. P., SANHUEZA C. E. P., GONZÁLEZ H. H. L., RESNIK S. L. (1993). Fumonisins in

- Argentinian field-trial corn. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 891-895.
- SYDENHAM E. W., SHEPHARD G. S., THIEL P. G., MARASAS W. F. O., STOCKENSTRÖM S. (1991). Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39, 2014-2018.
- SYDENHAM E. W., THIEL P. G., SHEPHARD G. S., KOCH K. R., HUTTON T. (1995). Preparation and isolation of the partially hydrolysed moiety of fumonisin B₁. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 2400-2405.
- TAJIMA O., SCHOEN E. D., FERON V. J., GROTEN J. P. (2002). Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of *Fusarium* mycotoxins for possible interactions. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 685-695.
- TARDIEU D., TRAN S. T., AUVERGNE A., BABILÉ R., BENARD G., BAILLY J. D., GUERRE P. (2006). Effects of fumonisins on liver and kidney sphinganine and the sphinganine to sphingosine ratio during chronic exposure in ducks. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 51-60.
- THIEL P. G., MARASAS W. F. O., SYDENHAM E. W., SHEPHARD G. S., GELDERBLOM W. C. A., NIEUWENHUIS J. J. (1991). Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1089-1093.
- THIEL P. G., MARASAS W. F. O., SYDENHAM E. W., SHEPHARD G. S., GELDERBLOM W. C. A. (1992). The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia*, 117, 3-9.
- TRAN S. T., BAILLY J. D., TARDIEU D., DURAND S., BENARD G., GUERRE P. (2003). Sphinganine to sphingosine ratio and predictive biochemical markers of fumonisin B₁ exposure in ducks. *Chemico-Biological Interactions*, 146, 61-72.
- TRUCKESS M. W., STACK M. E., ALLEN S., BARRION N. (1995). Immunoaffinity column coupled with liquid chromatography for determination of fumonisin B₁ in canned and frozen sweet corn. *Journal of AOAC International*, 78, 705-710.
- TSENG T. -C., LIU C. -Y. (1997). Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in corn-based foodstuffs in Taiwan market. *Mycopathologia*, 137, 57-61.
- TURNER P. C., NIKIEMA P., WILD C. P. (1999). Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mutation Research*, 443, 81-93.

- USFDA-CFSAN (2001a). Fumonisin levels in human foods and animal feeds. Available at <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumongu2.html>. Accessed on 12.09.2003.
- USFDA-CFSAN (2001b). Background paper in support of fumonisins levels in corn and corn products intended for human consumption. Available at <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumongu3.html>. Accessed on 12.09.2003.
- USFDA-CFSAN (2001c). Background paper in support of fumonisin levels in animal feed: executive summary of this scientific support document” p. 18 Available at www.cfsan.fda.gov/~dms/fumonbg4.html. Accessed on 12.09.2003.
- USLEBER E., STRAKA M., TERPLAN G. (1994). Enzyme immunoassay for fumonisin B applied to corn-based food. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 1392–1396.
- VALENTA H. (1998). Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids *Journal of Chromatography A*, 815, 75-92.
- VELÁZQUEZ C., LLOVERA M., PLANA J., CANELA R. (2000). Effect of solvents on the fumonisins analysis by HPLC with AccQ.Fluor as the derivatizing reagent. *Journal of Chromatography A*, 870, 469-472.
- VISCONTI A., DOKO M. B. (1994). Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *Journal of AOAC International*, 77, 546-550.
- VISCONTI A., SOLFRIZZO M., GIROLAMO A. (2001). Determination of FB₁ and FB₂ in corn and corn flakes by LC with IAC clean-up: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 84, 1828-1837.
- VOSS K. A., RILEY R. T., NORRED W. P., BACON C. W., MEREDITH F. I., HOWARD P. C., PLATTNER R. D., COLLINS T. F. X., HANSEN D. K., PORTER J. K. (2001). An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. *Environmental Health Perspectives*, 109 (suppl. 2), 259-266.
- WAALWIJK C., KOCH S. H., NCUBE E., ALLWOOD J., FLETT B., VRIES I., KEMA G. H. J. (2008). Quantitative detection of *Fusarium* spp. and its correlation with fumonisin content in maize from South African subsistence farmers. *World Mycotoxin Journal*, 1, 39-47.

- WANG E., NORRED W. P., BACON C. W., RILEY R. T., MERRIL A. H. JR. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 14486-14490.
- WANG E., NORRED W. P., RILEY R. T., MEREDITH F. I., MERRIL A. H. JR. (1999). Fumonisin B₁ consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. *Journal of Nutrition*, 129, 214-220.
- WANG H., JONES C., CICCIZANELLA J., HOLT T., GIL CHRIST D. C., DICKMAN M. B. (1996). Fumonisin and *Alternaria alternatalycopersici* toxins: sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 3461-3465.
- WANG J., ZHOU Y., LIU W., ZHU X., DU L., WANG Q. (2008). Fumonisin level in corn-based food and feed from Linxian County, a high-risk area for esophageal cancer in China. *Food Chemistry*, 106, 241-246.
- WEIDENBÖRNER, M. (2001). Foods and fumonisins. *European Food Research and Technology*, 212, 262-273.
- Westhuizen L., Brown N.L., Marasas W.F.O., Swanevelde S., Shephard G.S. (1999). Sphinganine/Sphingosine ratio in plasma and urine as a possible biomarker for fumonisin exposure in humans in rural areas of Africa. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 1153-1158.
- WESTHUIZEN L., GELDERBLUM W. C. A., SHEPHARD G. S., SWANEVELDER S. (2004). Disruption of sphingolipid biosynthesis in hepatocyte nodules: selective proliferative stimulus induced by fumonisin B₁. *Toxicology*, 200, 69-75.
- WESTHUIZEN L., SHEPHARD G. S., SCUSSEL V. M., COSTA L. L. F., VISMER H. F., RHEEDER J. P., MARASAS W. F. O. (2003). Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 5574-5578.
- WHO. (2002). Evaluation of certain mycotoxins in food. Report of the 56th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO technical report series 906. Geneva, Switzerland: WHO.
- WILLIAMS L. D., BACON C. W., MEREDITH F. I., FRANZLUEBBERS A. J., WYATT R. D., SMITH M. A., RILEY R. T. (2003). Leaching and binding of fumonisins in soil microcosms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 685-690.

- WILLIAMS L. D., MEREDITH F. I., RILEY R. T. (2004). Fumonisin-ortho-phthalaldehyde derivative is stabilized at low temperature. *Journal of Chromatography B*, 806, 311-314.
- WOLOSHUK C. P., SHIM W. (2001). Regulation of fumonisin B₁ biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like(C-type) gene, *FCC*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1607-1612.
- WU F. (2004). Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards. *Environmental Science and Technology*, 38, 4049-4055.
- XIE W., MIROCHA C. J., CHEN J. (1997). Detection of two naturally occurring structural isomers of partially hydrolysed fumonisin B₁ in corn by On-Line Capillary Liquid Chromatography – Fast Atom Spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 1251-1255.
- YOO H. -S, NORRED W. P., RILEY R. T. (1996). A rapid method for quantifying free sphingoid bases and complex sphingolipids in microgram amounts of cells following exposure to fumonisin B₁. *Toxicology in vitro*, 10, 77-84.
- YOSHIZAWA T., YAMASHITA A., LUO Y. (1994). Fumonisin occurrence in corn from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1626.
- ZINEDINE A., BRERA C., ELAKHDARI S., CATANO C., DEBEGNACH F., ANGELINI S., SANTIS B. D., FAID M., BENLEMLIH M., MINARDI V., MIRAGLIA M. (2006). Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control*, 17, 868-874.
- ZÖLLNER P., MAYER-HELM B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1136, 123–169.
- ZUMAN P. (2005). Reactions of orthophthalaldehyde and related compounds with aminoacids. *Analytical. Letters*, 38, 1213-1220.