

Avaliação de métodos para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa

Evaluation of analytical methods for the determination of trichothecenes in corn by gas chromatography

Adriana de Q. OLIVEIRA¹
Lucia M. VALENTE SOARES^{1*}

RIALA6/904

Oliveira, A.Q.; Valente Soares, L.M. Avaliação de métodos para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):129-134, 2001.

RESUMO. Sistemas de extração e limpeza foram avaliados para a determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama. O método de extração e limpeza descrito por Furlong & Soares (1995), combinado com uma coluna de limpeza preconizada por Romer (1986), foi o sistema que apresentou melhores resultados. Para extração foi usado metanol: cloreto de potássio 4% (9:1) seguido por clarificação com sulfato de amônio 30% e partição com diclorometano. A seguir, o extrato foi passado pela coluna de alumina: carvão (2,3:1,9) e os tricotecenos eluídos com acetonitrila: água (84:16). O extrato, após reação de derivação com anidrido trifluoroacético (TFAA) em piridina, foi injetado em um cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama. As recuperações médias obtidas foram 72% para desoxinivalenol (DON), 88% para diacetoxiscirpenol (DAS) e 87% para toxina T2 (T2). Os limites de detecção obtidos foram 30 ng/g para DON, 50 ng/g para DAS e 40 ng/g para T2. Os coeficientes de variação médios para amostras artificialmente contaminadas, com 500 ng/g de cada toxina foram 9,8, 6,3 e 6,6% para DON, DAS e T2, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE. Milho, micotoxinas, tricotecenos, desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, toxina T-2.

INTRODUÇÃO

Os tricotecenos são uma família de micotoxinas caracterizadas por um esqueleto tetracíclico 12,13-epoxi-tricotec-9-eno. Estas micotoxinas são compostas com funções éster e álcool na porção externa da molécula. Possuem uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 e um grupo epóxido entre os carbonos 12 e 13. Os tricotecenos são produzidos por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*,

Verticimonosporium, *Stachybotrys* e *Trichothecium*¹⁹. Um total de 148 tricotecenos são conhecidos. Porém, apenas alguns deles foram observados ocorrendo naturalmente, como por exemplo, o desoxinivalenol (DON), o nivalenol (NIV), a toxina T2 (T2), a toxina HT2 (HT2) e o diacetoxiscirpenol (DAS)⁶.

Cereais podem ser contaminados por diversas espécies de *Fusarium* e, desta maneira, torna-se a via pela qual estas toxinas entram na alimentação humana e animal. Dentre os vários cereais, o trigo e o milho têm sido apontados como mais

¹ Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

*¹ Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6121, 13081-970 Campinas, SP. e-Mail: valente@fea.unicamp.br

contaminados. O DON tem sido o tricoteceno mais freqüentemente encontrado nos cereais⁸.

Os sintomas característicos dos efeitos tóxicos dos tricotecenos em humanos e animais são vômitos, angina necrótica, diarreia, anorexia, alterações hematológicas, distúrbios neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragias generalizadas seguidas ou não de morte^{17,20}. A doença em humanos que está associada a estes sintomas chama-se Aleucia Tóxica Alimentar (ATA). Casos fatais desta doença ocorreram em 1913 e após a Segunda Guerra Mundial em populações localizadas em regiões da antiga Rússia^{12,17,19}.

Por estarem presentes em traços nos alimentos destinados ao consumo humano e rações animais, métodos analíticos sensíveis e específicos tornam-se necessários. O primeiro método desenvolvido para a determinação de tricotecenos em grãos foi por cromatografia em camada delgada (CCD) e os tricotecenos foram visualizados após o uso de reagentes reveladores. Um deles, o cloreto de alumínio, foi amplamente empregado para tricotecenos do grupo B⁸. A determinação de tricotecenos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é difícil em virtude da falta de absorção na faixa do ultra-violeta (UV), exceto para tricotecenos do grupo B. Para tricotecenos do grupo A, CLAE, com detecção por UV, é aplicada somente para amostras com altas concentrações de toxina. Vários pesquisadores descreveram a determinação de tricotecenos por CLAE após derivação. A desvantagem deste método está na presença de picos dos reagentes de derivação que interferem com os picos de alguns tricotecenos^{8,9,11}. Dentre os métodos cromatográficos, a cromatografia gasosa (CG) é a técnica mais empregada na determinação de tricotecenos em diversos tipos de amostras, com detecção por captura de elétrons (CE), espectrômetro de massas (EM) ou por ionização em chama (IC), respectivamente nesta ordem.

A cromatografia gasosa (CG), apesar de necessitar de extensas e trabalhosas etapas de limpeza, oferece alta resolução na separação através do emprego de colunas capilares. A seletividade e sensibilidade vão depender do sistema de detecção empregado. A versatilidade da CG facilita o desenvolvimento de métodos para análises de rotina no caso de amostras contendo vários tricotecenos². Esta técnica inclui etapas de extração, limpeza, e na maioria dos casos, uma reação de derivação compatível com o sistema de detecção utilizado. Os solventes empregados na etapa de extração são de caráter polar, como o metanol e a acetonitrila em misturas com água. Quando a extração é feita com metanol, uma etapa de clarificação se faz necessária. Um dos agentes precipitantes mais utilizados é o sulfato de amônio. Dependendo do tipo de amostra, quando muito gordurosa, há a necessidade de uma etapa de desengorduramento, normalmente, com n-hexano. Na etapa de limpeza, ou isolamento das toxinas, é comum o emprego de colunas de extração em fase sólida (SPE), e os adsorventes mais utilizados são carvão ativo, celite, alumina, sílica gel, Florisil individualmente ou em misturas^{3,7,10,13}.

A reação de derivação, previamente à separação cromatográfica a gás, é necessária para melhorar a volatilidade e

outras propriedades cromatográficas dos tricotecenos. Os agentes de derivação mais empregados para tricotecenos são o anidrido trifluoroacético (TFAA), o heptafluorobutirilimidazol (HFBI), o anidrido heptafluorobutírico (HFBA) e o pentafluoropropionilimidazol (PFPI).

Tendo em vista que dentre as técnicas cromatográficas a cromatografia gasosa oferece melhor resolução e sensibilidade na determinação de tricotecenos, o presente trabalho avaliou os métodos disponíveis, para este grupo de toxinas, baseados nesta técnica que melhor se adaptassem às condições dos laboratórios nacionais em termos de simplicidade, baixo custo de reagentes e uso de instrumentos mais facilmente encontrados em nossos laboratórios. Como detector foi escolhido o de ionização de chama (FID) por este ser mais comum em laboratórios nacionais que detectores de captura de elétrons, apesar do último ter sido muito mais utilizado com tricotecenos. A adequação do FID, no entanto, foi demonstrada em trabalhos anteriores³⁻⁵. O DON, o T2 e o DAS foram os tricotecenos selecionados para os testes devido ao primeiro ter sido o mais encontrado em cereais no mundo todo e o fato dos dois últimos serem os mais tóxicos dentre os tricotecenos não macrocíclicos¹⁹. As etapas seguidas na avaliação de metodologia foram: (a) avaliação de agentes de derivação, b) avaliação de sistemas de extração e limpeza para amostras de milho, e c) validação da metodologia escolhida para determinação de DON, DAS e T2 em milho.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Amostras de milho pipoca foram trituradas em moinho até passarem por uma peneira de 80 mesh, acondicionadas em recipientes de vidro e armazenadas a -18°C até o momento da análise.

2. Padrões

As soluções estoque individuais de cada tricoteceno – DON, T2 e DAS – (Sigma) foram preparadas pesando-se 1 mg da cada toxina, dissolvendo em 10 mL de benzeno, segundo Furlong & Soares³, e obtendo-se a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As soluções trabalho foram preparadas em concentração 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada toxina e acondicionadas em frascos âmbar vedados e armazenados a -18°C .

Metil araquidato (Poly Science) foi usado como padrão interno e a solução estoque foi preparada pesando-se 5 mg de metil araquidato, dissolvendo em 10 mL de n-hexano (grau cromatográfico) obtendo-se a concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A solução trabalho foi preparada em concentração 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta solução foi acondicionada em frasco âmbar vedado e armazenado a -18°C .

3. Reagentes e Adsorventes

Anidrido trifluoroacético (Merck), Heptafluorobutirilimidazol (Pierce), carvão ativo (60 mesh e 100-400 mesh/

Sigma), celite, alumina, Florisil (100-400 mesh/Merck), Amberlite IRP-64 (100-400 mesh/Sigma), Amberlite CG-50 (100-200 mesh/Sigma) e Amberlite IR-120 (Merck).

4. Condições Cromatográficas

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

5. Avaliação de Reagentes de Derivação

Dois agentes de derivação foram testados o HFBI (heptafluorobutirilimidazol) e o TFAA (anidrido trifluoroacético).

5.1. Derivação com HFBI: esta derivação foi realizada conforme o método de Furlong & Soares (1995)³.

Tabela 1. Sistemas de extração e limpeza testados na determinação de tricotecnos em milho.

| Solvente de extração | Etapas de limpeza de extrato |
|--|--|
| Metanol:4% KCl (9+1) ³ | Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ³ Partição para clorofórmio ³ Coluna carvão:alumina:celite (0,7:0,5:0,3) ³ |
| Metanol:4% KCl (9+1) ³ | Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ³ Partição para clorofórmio ³ Coluna Florisil (2g) |
| Metanol:4% KCl (9+1) ³ | Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ³ Partição para clorofórmio ³ Coluna alumina:carvão (2,3:1,9) ¹³ |
| Acetonitrila:água (84+16) ⁷ | Coluna alumina:carvão (2,3:1,9) ¹³ |
| Acetonitrila:água (3+1) ¹⁸ | Coluna alumina:carvão (2,3:1,9) ¹³ |
| Acetonitrila:água (85+15) ⁹ | Coluna alumina:carvão:resina trocadora de íons (20+1+40) ⁹ |
| Acetonitrila:água (85+15) ⁹ | Coluna alumina:carvão:resina trocadora de íons (2,3+1,9+2,0) |
| Acetonitrila:água (3+1) ¹⁸ | Coluna alumina:carvão:resina trocadora de íons (2,3+1,9+2,0) |
| Metanol ¹⁴ | Coluna C18 ¹⁴ Coluna sílica gel ¹⁴ |
| Metanol:água (1+1) ¹⁵ | Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ¹⁵ Partição para acetato de etila ¹⁵ Coluna alumina:carvão (2,3:1,9) ¹³ |
| Metanol:água (7+3) ¹⁶ | Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ¹⁶ Partição com acetato de etila ¹⁶ Coluna alumina:carvão (2,3:1,9) ¹³ |
| Metanol:4% KCl (9+1) ³ | Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ³ Partição para diclorometano Coluna alumina:carvão (2,3:1,9) ¹³ |

5.2. Derivação com TFAA: para este reagente de derivação duas bases foram testadas, o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e a piridina.

5.2.1. Reação em presença de bicarbonato de sódio (TFAA/NaHCO₃): 20 mg de NaHCO₃ e 200 µL de TFAA foram adicionados a um resíduo de padrão ou amostra e levados ao banho-maria a 60 °C por 60 minutos. Após esfriar, n-hexano foi adicionado e a seguir a mistura foi evaporada. Foram adicionados 500 µL de tolueno e duas vezes 1000 µL de água deionizada. Uma alíquota da fase orgânica foi transferida para um frasco contendo o padrão interno e a solução foi seca. O derivado seco foi ressuspensionado em 100 µL de n-hexano e injetado no cromatógrafo a gás.

5.2.2. Reação em presença de piridina (TFAA/piridina): Foram adicionados 1000 µL de solução de 1,5 mg/mL de piridina em tolueno:acetonitrila (95:5) e 200 µL de TFAA ao resíduo de padrão ou amostra e levados ao banho-maria a 60 °C por 60 minutos. Foram então adicionados 2 vezes 1000 µL de KH₂PO₄ 5%. Uma alíquota da fase orgânica foi transferida para um frasco contendo padrão interno. A solução foi seca, ressuspensionada com 100 µL de n-hexano e análise cromatográfica realizada.

6. Avaliação de Sistemas de Extração e Limpeza

Os sistemas de extração e limpeza testados estão dispostos na Tabela 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Escolha do reagente de derivação e otimização de condições

Dois reagentes de derivação foram escolhidos para teste devido ao seu amplo uso na determinação de tricotecnos, o heptafluorobutirilimidazol (HFBI) e o anidrido trifluoroacético (TFAA). Um outro grupo de reagentes, os agentes de silição, foram ignorados devido ao fato de muito rapidamente causarem depósitos no detector aumentando as despesas com a manutenção do instrumento.

A derivação do DON com HFBI gerou um cromatograma com poucos picos além do tri-heptafluorobutiril desoxinivalenol (DON-tri-HFB) e do padrão interno (Pi). A área relativa (Área_{DON}/Área_{Pi}) obtida foi 1,24. A derivação do DON com TFAA em presença de bicarbonato de sódio produz o tri-trifluoroacetil desoxinivalenol (DON-tri-TFA). O cromatograma resultante apresentou menos picos que o gerado com o HFBI. A reação produziu um derivado para o qual o detector apresentou maior sensibilidade, em virtude do aumento da área relativa (Área_{DON}/Área_{Pi}). Com este sistema de derivação, a (Área_{DON}/Área_{Pi}) obtida foi 1,82. A reação de DON com TFAA foi também testada em presença de piridina. O composto formado, como anteriormente, foi o DON-tri-TFA. Houve um aumento na área relativa (Área_{DON}/Área_{Pi}), que passou de 1,82 para 2,62. Este aumento proporcionou a utilização de quantidades bem menores de solução padrão dos tricotecnos, aumentando assim a sensibilidade do método. Portanto, em virtude desta vantagem apresentada pelo sistema de derivação TFAA/piridina em comparação com o HFBI,

o primeiro foi o sistema escolhido para as derivações dos tricotecenos no presente trabalho (Figura 1).

2. Avaliação de sistemas de extração e limpeza

Vários sistemas de extração e limpeza foram testados (Tabela 1) e a maioria apresentou desde dificuldades de execução, tais como formação de grânulos no fundo da vidraria, dissolução incompleta em etapas de re-suspensão e ainda presença visível de gordura nos extratos. Nas diferentes colunas de limpeza, variantes dos solventes de eluição propostos foram também testados. Uma etapa de desengorduramento foi acrescentada nos casos em que a presença de gordura era observada e esta foi realizada previamente à análise em aparelho de Goldfisher por 3 horas.

Para limpeza, três tipos de resinas trocadoras de íons (Amberlite IR-120, IRP-64 e CG-50) foram testadas na montagem das colunas. Todas as colunas precisaram ser eluídas sob vácuo, em virtude da granulometria tanto do carvão (100-400 mesh) como das resinas Amberlite IRP-64 (100-400 mesh) e CG-50 (100-200 mesh). Os testes de recuperação realizados com padrão de toxina T2 puro nas colunas apresentaram baixos resultados, isto é, a toxina ficava retida na coluna. A coluna que continha a resina Amberlite IR-120 reteve 37% da toxina, já as resinas Amberlite IRP-64 e CG-50 retiveram 83% e 77% respectivamente.

Dos diversos sistemas testados o único a apresentar uma recuperação adequada, acompanhada de cromatogramas sem interferentes e ausência de dificuldades de execução, foi método de extração descrito por Furlong & Sores (1995)³, combinado com a coluna de limpeza de Romer (1986)¹³. O método resultante está descrito a seguir.

Homogeneizar cinquenta gramas de amostra com 270 mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4% por 5

minutos em liquidificador. Filtrar, tomar uma alíquota de 150 mL e proceder à clarificação com 150 mL de sulfato de amônio 30% e 50 cm³ de celite. Novamente tomar uma alíquota de 150 mL e colocar em um funil de separação já contendo 150 mL de água destilada. Realizar a partição, lentamente por 3 minutos, com 15 mL de diclorometano. Deixar em repouso por 10 minutos e recolher toda a fase orgânica em um béquer de 50 mL. Proceder novamente à partição e recolher a fase orgânica no mesmo béquer anterior. Agitar por 20 segundos em ultra-som para homogeneizar os extratos. Tomar uma alíquota de 15 mL secar em banho de água a 50 °C e proceder à etapa de limpeza. O volume restante (extrato B) secar e guardar (a -18 °C) para realizar reações de confirmação de identidade quando a amostra estiver contaminada.

Para limpar o extrato A seco, dissolvê-lo com 5 x 1 mL de acetonitrila:água (84:16) e aplicá-lo na coluna de alumina:carvão (2,3:1,9). A coluna deve ser previamente preparada em uma coluna de vidro com 1,5 cm de diâmetro interno e recheada a seco com 1,1 cm de alumina seguida de 4,0 cm de carvão ativo e, em seguida, condicionada com 15 mL de acetonitrila:água (84:16). O topo e a base do recheio devem ser forrados com lã de vidro. Eluir a amostra com 40 mL de acetonitrila:água (84:16) a uma vazão de 1 mL/min. Concentrar o eluato, em banho de água a 80 °C, até cerca de 2 mL e transferi-lo quantitativamente para frasco de reação de 4 mL e secá-lo

Ao extrato seco adicionar 1 mL de solução de 1,5 mg/mL de piridina em tolueno:acetonitrila (95:5) e 200 µL de TFAA. Levar a banho de água a 60 °C por 60 minutos. Deixar esfriar a temperatura ambiente, adicionar 1 mL de KH₂PO₄ 5% e agitar por 30 segundos em ultra-som. Tomar uma alíquota de 850 µL e colocá-la em um segundo frasco contendo 1 mL de KH₂PO₄ 5% e agitar novamente. Tomar uma alíquota de 650 µL e juntá-la ao padrão interno (3 µg) num terceiro frasco. Secar a 50 °C sob leve fluxo de N₂. Re-suspender com 100 µL de n-hexano (grau cromatográfico) e analisar por cromatografia gasosa nas seguintes condições: temperatura injetor (275 °C), temperatura do detector (300 °C), programação da coluna (100 °C/1 min, 6 °C/min até 220 °C/20 min), vazão do gás de arraste (3,6 mL/min) e fluxo de limpeza do injetor (50 mL/min). O volume de injeção foi 1 µL, o modo de injeção *splitless* e o tempo de início para a purga (0,75 min).

As Figuras 2 e 3 mostram cromatogramas de amostras analisadas por este sistema.

3. Validação intralaboratorial da metodologia escolhida para determinação de tricotecenos em milho

A recuperação e a repetibilidade foram testadas em amostras artificialmente contaminadas com 0,5 µg/g de cada tricoteceno (DON, DAS, T2). As amostras, assim contaminadas, foram extraídas e clarificadas de acordo com o método de Furlong & Soares (1995)³, passadas pela coluna de alumina:carvão (2,3:1,9) Romer (1986)¹³, eluídas com acetonitrila:água (84:16) e derivadas com TFAA-piridina.

Dezoito repetições foram realizadas para se obter os valores médios de recuperação e repetibilidade do método. Os

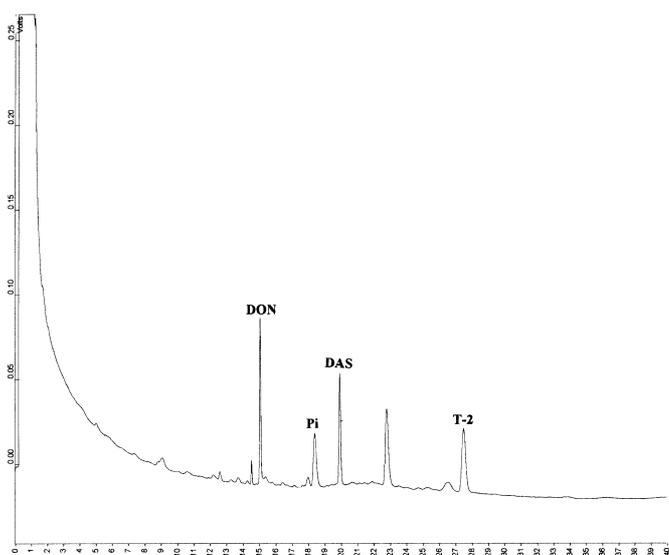


Figura 1. Perfil cromatográfico de uma mistura de padrões de DON, DAS e T2 derivados com TFAA em presença de piridina.

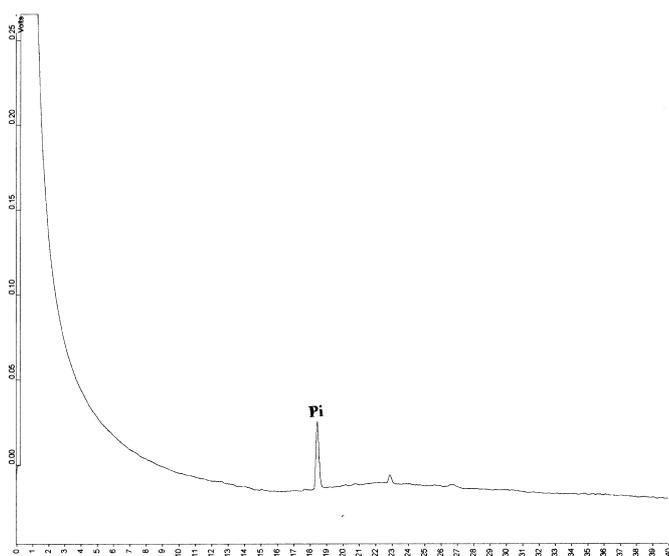


Figura 2. Perfil cromatográfico de uma amostra de milho pipoca não contaminada utilizando o sistema de extração e limpeza descrito por Furlong & Soares³ combinado à coluna de limpeza de Romer¹³ (Pi = padrão interno) e submetida à derivação com TFAA.

valores médios de recuperação foram 72% para DON, 88% para DAS e 87% para T2. A repetibilidade do método mostrou-se adequada com desvios padrão relativos (RSD) de 9,8% para DON, 6,3% para DAS e 6,6% para a T2. As curvas de calibração do DON, da T2 e do DAS foram lineares de 10 a 65 ng/ μ L, de 10 a 65 ng/ μ L e de 10 a 85 ng/ μ L respectivamente.

Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados de acordo com o sugerido pela “American Chemical Society”¹ com a seguinte modificação: em vez de medir o ruído em um cromatograma de uma amostra não contaminada (um branco), uma amostra não contaminada foi fortificada com padrão de cada tricoteceno (DON, DAS e T2), derivada com TFAA-piridina e injetada 5 vezes no cromatógrafo gasoso. O desvio padrão (RSD) destas injeções foi então calculado fornecendo uma medida do ruído do instrumento nas condições usadas na análise. Esta maneira de medir ruído é usada em alguns campos de espectroscopia²¹ e é de obtenção mais simples para o analista e o ruído de curto prazo é o mesmo para amostra ou linha de base conforme pode ser observado na prática quando níveis baixos do analito, próximos ao limite de detecção, são empregados. O limite de detecção de cada tricoteceno foi determinado como sendo a menor quantidade capaz de gerar um sinal três vezes maior que o ruído. O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração que produzisse um sinal cinco vezes maior que o limite de detecção. Os limites de detecção do método proposto foram 30, 50 e 40 ng/g e os de quantificação foram 150, 250 e 200 ng/g para DON, DAS e T2, respectivamente.

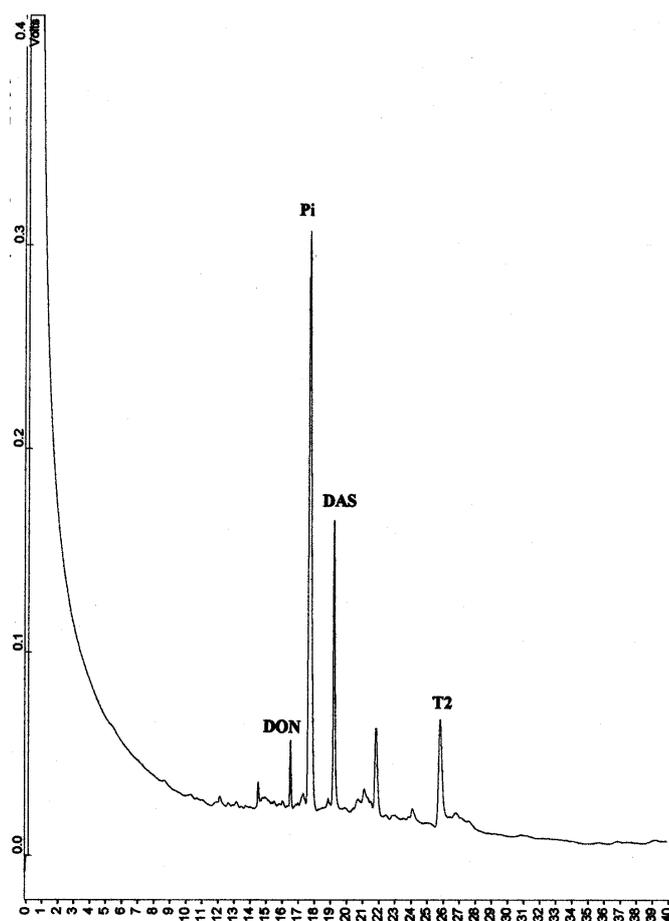


Figura 3. Perfil cromatográfico de uma amostra de milho pipoca não contaminada enriquecida com padrões de DON, DAS e T2 e extraída e limpa pelo sistema de extração e limpeza descrito por Furlong & Soares³ combinado à coluna de limpeza de Romer¹³ (Pi = padrão interno) e submetida à derivação com TFAA.

CONCLUSÕES

Quanto ao método de extração e limpeza, o melhor resultado da combinação do sistema de extração e limpeza descrito por Furlong & Soares (1995)³ combinado com coluna de limpeza de alumina:carvão (2,3:1,9) preconizada por Romer (1986)¹³.

Avaliação intralaboratorial incluiu recuperação e repetibilidade as quais foram testadas em amostras contaminadas com 0,5 μ g/g de cada tricoteceno (DON, DAS T2). Os valores médios de recuperação foram 72% para DON, 88% para DAS e 87% para T2. A repetibilidade do método mostrou-se adequada com desvios padrão relativos (RSD) de 9,8% para DON, 6,3% para DAS e 6,6% para a T2. As curvas de calibração do DON, da T2 e do DAS foram lineares de 10 a 65 ng/ μ L, de 10 a 65 ng/ μ L e de 10 a 85 ng/ μ L respectivamente. Os limites de detecção obtidos para cada tricoteceno foram 30 ng/g para DON, 50 ng/g para DAS e 40 ng/g para T2.

Dos reagentes de derivação testados, heptafluorobutirilimidazol (HFBI) e anidrido trifluoroacético (TFAA), o TFAA gerou melhores resultados, cromatogramas limpos e necessitou de menores quantidades de padrão de tricotecenos, tornando o método mais sensível.

AGRADECIMENTOS

A primeira autora, A.Q. Oliveira agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de estudos concedida.

RIALA6/904

Oliveira, A.Q.; Valente Soares, L.M. Evaluation of analytical methods for the determination of trichothecenes in corn by gas chromatography. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):129-134, 2001.

ABSTRACT. Extraction and cleanup systems were evaluated for the determination of trichothecenes in corn by gas chromatography with flame ionization detector. The extraction and cleanup method described by Furlong & Soares (1995), combined with the Romer (1986) cleanup column exhibited the best results. The extraction used methanol: 4% potassium chloride (9:1), followed by a clarification with 30% ammonium sulfate, and partition with dichloromethane. The extract was then passed through an alumina:carbon column (2.3:1.9) and eluted with acetonitrile:water (84:16). Trifluoroacetic anhydride in the presence of pyridine was used for derivatization before injection in a gas chromatograph with an ionization detector. The average recoveries were 72% for deoxynivalenol (DON), 88% for diacetoxyscirpenol (DAS) and 87% for toxin T2 (T2). The detection limits were 30 ng/g for DON, 50 ng/g for DAS and 40 ng/g for T2. The average coefficients of variation for spiked samples at the 500 ng/g level were 9.8, 6.3 e 6.6% for DON, DAS, and T2, respectively.

KEY WORDS. Corn, mycotoxins, trichothecenes, deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, toxin T2.

REFERÊNCIAS

1. American Chemical Society. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. **Anal. Chem.**, 52:2242-2249, 1980.
2. Croteau, S.M.; Prelusky, D.B.; Trenholm, H.L. Analysis of trichothecenes mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection. **J. Agric. Food Chem.**, 42:928-933, 1994.
3. Furlong, E.B.; Soares, L.M.V. Gas chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. **J. AOAC Int.**, 78:386-390, 1995.
4. Furlong, E.B.; *et al.* Mycotoxins and fungi in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Add. Contam.**, 12:683-688, 1995.
5. Furlong, E.B.; *et al.* Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, 131:185-190, 1995.
6. Kotal, F.; *et al.* Determination of trichothecenes in cereals. **J. Chromatogr. A.**, 830:219-225, 1999.
7. Langseth, W.; Clasen, P.E. Automation of a clean-up procedure for determination of trichothecenes in cereals using a charcoal-alumina column. **J. Chromatogr. A.**, 603:290-293, 1992.
8. Langseth, W.; Rundberget, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **J. Chromatogr.**, 815:103-121, 1998.
9. Lauren, D.R.; Greenhalgh, R. Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 70:479-483, 1987.
10. Marochi, M.A.; Soares, L.M.V. Metodologia para determinação de tricotecenos e zearalenona em grãos. **Bol. S.B.C.T.A.**, 27:1-8., 1993.
11. Maycock, R., Utley, D. Analysis of some trichothecene mycotoxins by liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, 347:429-433, 1985.
12. Osborne, B.G. Mycotoxins and the cereals industry – a review. **J. Food Tech.**, 17:1-9, 1982.
13. Romer, T.R. Use of small charcoal/alumina clean-up columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 69:699-703, 1986.
14. Rosen, R.T.; Rosen, J.D. Quantification and confirmation of four *Fusarium* mycotoxins in corn by gas-chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. **J. Chromatogr.**, 283:223-230, 1984.
15. Scott, P.M.; Lau, P.Y.; Kanhere, S.R. Gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and other grains. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 64:1364-1371, 1981.
16. Scott, P.M.; Kanhere, S.R.; Tarter, E.J. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by electron-capture gas chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 69:889-893, 1986.
17. Snyder, A.P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. **J. Food Prot.**, 49:544-569, 1986.
18. Tanaka, T. *et al.* Improved methodology for simultaneous detection of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. **Food Add. Contam.**, 2:125-137, 1985.
19. Ueno, Y. (ed). Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Tokyo, Kodansha-Elsevier, 1983, 313 p.
20. Ueno, Y. Trichothecenes as Environmental Toxicants. **Reviews in Environmental Toxicology 2**, Amsterdam, p. 303-341, 1986.
21. Van Loon, J.C. Analytical atomic absorption spectroscopy. New York, Academic Press, 1980, 337 p.

Recebido em 15/03/2001; Aprovado em 07/03/2002