

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Nínive Alves Vieira de Matos

**FUMONISINAS LIVRES E MASCARADAS EM MILHO E PRODUTOS À BASE DE
MILHO NO BRASIL**

Rio de Janeiro

2018

Nínive Alves Vieira de Matos

**FUMONISINAS LIVRES E MASCARADAS EM MILHO E PRODUTOS À BASE DE
MILHO NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Dra. Silvana do Couto Jacob
Colaborador: Dr. André Victor Sartori

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Matos, Nínive Alves Vieira de

Fumonisinhas livres e mascaradas em milho e produtos à base de milho no Brasil. / Nínive Alves Vieira de Matos. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

132 f: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

Orientadora: Dra. Silvana do Couto Jacob.

Colaborador: Dr. André Victor Sartori.

1. Fumonisinhas. 2. Zea Mays. 4 Cromatografia Líquida. 5. Espectrometria de Massas. I. Título.

FREE AND MASKED FUMONISINS IN MAIZE AND MAIZE-BASED PRODUCTS IN BRAZIL

Nírive Alves Vieira de Matos

**FUMONISINAS LIVRES E MASCARADAS EM MILHO E PRODUTOS À BASE DE
MILHO NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

Maria de Lourdes Mendes de Souza (Doutora)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Lucia Helena Pinto Bastos (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

Aos meus pais Nivalda e Luiz, e ao meu esposo Júnior, por todo apoio e incentivo ao meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me sustentou e me ajudou até aqui.

Ao meu esposo Júnior pela ajuda, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Ao André Sartori pela confiança, paciência, ensinamentos e apoio na realização deste trabalho.

A Eloiza Rodrigues pela grande amizade, companhia e ajuda na realização deste trabalho.

A Rosana Santos e Maria Heloísa por todos os ensinamentos, amizade e momentos de descontração.

A minha orientadora Silvana do Couto Jacob por toda confiança e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Sérgio Alves pela ajuda na estatística.

A todos os amigos do laboratório de Micotoxinas e do INCQS que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

A ocorrência de fumonisinas livres e mascaradas foi avaliada na análise de 212 amostras milho pipoca, fubá, flocos de milho pré-cozidos, canjiquinha, farinha de milho, canjica branca e curau de milho. Foram desenvolvidos e validados dois métodos analíticos, sendo um utilizado na determinação direta das fumonisinas B1 (FB1) e B2 (FB2) e fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas (HFB1 e HFB2) livres e o outro para determinação indireta de fumonisinas totais (livres + ligadas) em milho e produtos à base de milho por cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM). No tratamento das amostras para a determinação direta de fumonisinas livres foi utilizado um procedimento relativamente simples onde se utilizou extração com mistura de solventes e etapas rápidas de agitação e sonificação, seguida da diluição dos extratos. As fumonisinas totais foram quantificadas indiretamente pelas formas hidrolisadas obtidas após hidrólise alcalina das amostras, sendo que a eficiência da hidrólise alcalina foi otimizada. Recuperações satisfatórias (89,3–110,5%) com desvios padrão relativos inferiores a 14% foram obtidos para todas as micotoxinas alvo nos dois métodos estudados. Os métodos apresentaram sensibilidade adequada com limites de quantificação (LQ) inferiores a 10 µg/kg para todas as micotoxinas, atendendo aos limites máximos tolerados no Brasil para o somatório das fumonisinas B1 e B2 em milho pipoca e produtos à base de milho. O método para determinação de fumonisinas livres foi aplicado com sucesso na análise de 212 amostras de milho pipoca e produtos à base de milho, sendo que os níveis encontrados não excederam o limite máximo tolerado (LMT) de acordo com a RDC n° 07/2011. O método para determinação indireta de fumonisinas totais (livres + ligadas) foi aplicado na análise de 87 amostras; as fumonisinas totais foram encontradas em níveis de concentração de 1,1 a 2,7 vezes maiores que as concentrações de fumonisinas livres. Os resultados encontrados nesse estudo demonstram a importância do monitoramento de fumonisinas e fumonisinas mascaradas em milho e alimentos à base de milho.

Palavras chave: Fumonisinas. Fumonisinas mascaradas. Milho. Produtos à Base de Milho. CLUE-EM/EM.

ABSTRACT

The occurrence of free and masked fumonisins were evaluated in 212 popcorn, corn meal, pre-cooked corn flakes, canjiquinha (corn grits), corn meal, white canjica (white maize kernels) and corn pudding samples. Two analytical methods were developed and validated, one for the direct determination of fumonisins B1 (FB1) and B2 (FB2) and free hydrolyzed fumonisins B1 and B2 (HFB1 and HFB2) and the other for the indirect determination of total fumonisins (free + bound) in the corn and corn-product samples, both by Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). A relatively simple sample treatment procedure was applied for the direct determination of free fumonisins, consisting of solvent extraction and rapid agitation and sonication, followed by extract dilution. Total fumonisins were indirectly quantified by the hydrolyzed forms obtained after alkaline hydrolysis of the samples, which was optimized. Satisfactory recoveries (89.3-110.5%) with relative standard deviations of less than 14% were obtained for all target mycotoxins in both evaluated methods. The methods showed adequate sensitivity with limits of quantification (LQ) of less than 10 µg/kg for all mycotoxins, considering the maximum limits tolerated in Brazil for the sum of fumonisins B1 and B2 in popcorn and corn products. The free fumonisin determination method was successfully applied in the analysis of 212 popcorn and maize product samples and detected levels did not exceed the maximum tolerated limit (MTL) according to Brazilian RDC No. 07/2011. The method for indirect total fumonisin (free + bound) determination was applied to 87 samples, and total fumonisins were detected at concentration levels 1.1 to 2.7-fold higher than free fumonisin concentrations. The results reported herein demonstrate the importance of monitoring fumonisins and masked fumonisins in corn and corn-based foods.

Key-words: Fumonisins. Masked fumonisins. Maize. Maize Products. UPLC-MS/MS.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Ocorrência de fumonisinas livres em milho e produtos à base de milho no mundo	26
Tabela 2- Ocorrência de fumonisinas livres em milho, milho pipoca e produtos à base de milho no Brasil.	29
Tabela 3- Limites máximos toleráveis para fumonisinas em milho, milho pipoca e produtos à base de milho no Brasil.	31
Tabela 4- Limites máximos de fumonisinas tolerados pela Comunidade Europeia em milho e produtos à base de milho.....	32
Tabela 5- Condições do espectrômetro de massas selecionadas.	62
Tabela 6- Estudo da homogeneidade da amostra de milho pipoca (homogeneizada por 1 h) em função da quantidade de amostra analisada.	69
Tabela 7- Estudo da homogeneidade da amostra utilizando 5 g de amostra no método de tratamento da amostra.	70
Tabela 8- Avaliação da influência da etapa de homogeneização para as fumonisinas B1 e B2.	70
Tabela 9- Recuperações e repetibilidades obtidas para os procedimentos avaliados.	72
Tabela 10- Resultados de <i>p</i> -valor encontrados para fumonisinas livres na comparação das curvas analíticas em solvente com as matrizes estudadas.	79
Tabela 11- Resultados de <i>p</i> -valor encontrados para fumonisinas totais na comparação das curvas analíticas em solvente com as matrizes estudadas.	79
Tabela 12- Extensão do efeito matriz sobre as fumonisinas livres nas matrizes estudadas.....	80
Tabela 13- Extensão do efeito matriz sobre as fumonisinas totais nas matrizes estudadas.....	80
Tabela 14- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de milho pipoca.	82
Tabela 15- Validação do método utilizado na determinação indireta de fumonisinas totais (após hidrólise alcalina) em milho pipoca.	83

Tabela 16- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de flocos de milho.	83
Tabela 17- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de farinha de milho.....	83
Tabela 18- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de fubá.	84
Tabela 19- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de canjiquinha.	84
Tabela 20- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de canjica branca.	84
Tabela 21- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de curau de milho.....	85
Tabela 22- Resultados da contaminação encontrada para as fumonisinas livres nas 212 amostras de milho pipoca e produtos à base de milho ($\mu\text{g kg}^{-1}$).	87
Tabela 23- Comparação das razões encontradas de fumonisinas (B1 + B2) mascaradas/livres nos diferentes alimentos.....	94

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estruturas químicas das fumonisinas B1 [1] e B2 [2].	22
Figura 2- Estruturas químicas de NCM-FB1 e NDF-FB1.	23
Figura 3- Estruturas da fumonisina B1 livre, hidrolisada e ligada a macromoléculas.	24
Figura 4- Composição básica do grão de milho.	45
Figura 5- Processo de moagem seca dos grãos de milho.	46
Figura 6- Fluxograma do preparo das amostras para análise de fumonisinas livres.	55
Figura 7- Fluxograma do preparo das amostras para análise de fumonisinas totais (após hidrólise alcalina).	56
Figura 8- Cromatogramas demonstrando as intensidades das transições dos íons das fumonisinas B1, B2 e B1 e B2 hidrolisadas.	63
Figura 9- Cromatogramas demonstrando a ocorrência de efeito memória para as fumonisinas com o gradiente iniciando com 40% de metanol: a) solução padrão das fumonisinas (200 ng mL ⁻¹); b) solvente (metanol/água, 50:50 v/v).	65
Figura 10- Cromatogramas demonstrando a ausência de efeito memória para as fumonisinas com o gradiente iniciando com 65% de metanol: a) solução padrões das fumonisinas (200 ng mL ⁻¹); b) solvente (metanol/água, 50:50 v/v).	66
Figura 11- Cromatogramas demonstrando o efeito da adição de ácido fórmico no preparo das soluções de FB1 e FB2 (5 ng mL ⁻¹): a) soluções padrão preparadas em metanol/água (50:50 v/v) com ácido fórmico 0,1%; b) soluções padrão preparadas sem ácido fórmico (metanol/água, 50:50 v/v).	68
Figura 12- Avaliação do tempo de hidrólise das fumonisinas.	73
Figura 13- Intensidades relativas (%) obtidas utilizando diferentes solventes de diluição dos extratos (milho de pipoca).	75
Figura 14- Cromatogramas demonstrando a seletividade do método para determinação de fumonisinas livres (fumonisina B1= 1 ng mL ⁻¹ , fumonisina B2= 1 ng mL ⁻¹ , fumonisina B1 hidrolisada= 0,1 ng mL ⁻¹ e fumonisina B2 hidrolisada= 0,1 ng mL ⁻¹ no extrato final de milho pipoca).	76
Figura 15- Cromatogramas demonstrando a seletividade do método para determinação de fumonisinas totais após hidrólise (fumonisina B1 hidrolisada= 0,08	

ng mL ⁻¹ e fumonisina B2 hidrolisada= 0,015 ng mL ⁻¹ no extrato final de milho pipoca).	
.....	77
Figura 16- Resultados do somatório (FB1 + FB2) livres e totais em milho pipoca	91
Figura 17- Resultados do somatório (FB1 + FB2) livres e totais em fubá	91
Figura 18- Resultados do somatório (FB1 + FB2) livres e totais em flocos de milho	92
Figura 19- Resultados do somatório (FB1 + FB2) livres e totais em farinha de milho	
.....	92
Figura 20- Resultados do somatório (FB1 + FB2) livres e totais em curau de milho.	93
Figura 21- Resultados do somatório de (FB1 + FB2) livres e totais em canjiquinha de milho.....	93
Figura 22- Cromatogramas demonstrando uma amostra (118-16) de milho pipoca naturalmente contaminada.....	96

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3ADON	3-acetil-desoxinivalenol
15ADON	15-acetil-desoxinivalenol
15-ADON3G	15-acetil-DON-3-glicosídeo
15-ADON3S	15-acetil-DON-3-sulfato
ANCOVA	Análise de covariância
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE-DF	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
CLAE-EMAR	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução
CLUE-EM/EM	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
CG-DCE	Cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas
DON	Desoxinivalenol
D3G	Desoxinivalenol-3-glicosídeo
D15G	DON-15-glicosídeo
D15S	Desoxinivalenol-15-sulfato
D3S	Desoxinivalenol-3-sulfato
DON-3-GLcA	Desoxinivalenol-3-glucuronido
DON-15-GLcA	Desoxinivalenol-15-glucuronido
DON-GSH	DON-glutationa
DPR	Desvio padrão relativo
DIC	Detector por ionização em chama
ESI	Ionização por eletrospray

EFSA	European Food Safety Authority
FB1	Fumonisina B1
FB2	Fumonisina B2
FB's	Fumonisinias
HFB1	Fumonisina B1 hidrolisada
HFB2	Fumonisina B2 hidrolisada
HFB's	Fumonisinias hidrolisadas
HPLC	High performance liquid chromatography
HT2	Toxina HT-2
IARC	International Agency for Reseach on Cancer
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LACENs	Laboratórios Centrais Estaduais
LEME	Leucoencefalomalácia
LD	Limite de detecção
LMT	Limite máximo tolerado
LQ	Limite de quantificação
NCM	<i>N</i> -(carboximetil) fumonisina B1
ND	Não detectado
NDF	<i>N</i> -(1-deoxi-D-frutos-1-il) fumonisina B1
NIV3G	Nivalenol-3-Glicosídeo
HPLC	High performance liquid chromatography
OTA	Ocratoxina A
PROMAC	Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes
TOF	Tempo de voo
T2	Toxina T-2
ZEA	Zearalenona
ZEA4G	Zearalenona-4-glicosídeo
ZEA-14G	Zearalenona-14-glicosídeo
ZEA-16G	Zearalenona-16-glicosídeo
ZEA-14S	Zearalenona-14-sulfato
α -ZEA	Alfa-Zearalenona
β -ZEA	Beta-Zearalenona
α -ZEL-4G	Alfa-zearalenol-4-glicosídeo
β -ZEL-4G	Beta-zearalenol-4-glicosídeo

α -ZEL-14G	Alfa-zearalenol-14-glicosídeo
β -ZEL-14G	Beta-zearalenol-14-glicosídeo
α -ZEL-S	Alfa-zearalenol-sulfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Micotoxinas	21
2.2 Ocorrência de fumonisinas em milho e produtos à base de milho	24
2.3 Regulamentação para fumonisinas em milho e produtos à base de milho .	30
2.4 Micotoxinas mascaradas	33
2.4.1 Formação e ocorrência de micotoxinas mascaradas	33
2.4.2 Conversão das micotoxinas mascaradas para as formas livres e importância toxicológica.....	37
2.5 Métodos analíticos para a determinação de micotoxinas e micotoxinas mascaradas em alimentos	40
2.6 Características e processamentos do milho	44
3 OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo geral	48
3.2 Objetivos específicos	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Reagentes e solventes	49
4.2 Padrões analíticos	49
4.3 Equipamentos	49
4.3.1 Instrumental (CLUE- EM/EM).....	50
4.4 Amostras	50
4.5 Preparo das amostras	51
4.5.1 Homogeneidade das amostras.....	51
4.5.2 Otimização do método de preparo das amostras	52
4.5.3 Seleção do solvente de diluição do extrato da amostra	54
4.5.4 Fumonisinas livres.....	54
4.5.5 Fumonisinas totais (após hidrólise alcalina)	55
4.6 Validação	56
4.6.1 Seletividade	57
4.6.2 Efeito matriz	57
4.6.3 Linearidade.....	58

4.6.4 Exatidão e Precisão.....	58
4.6.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Instrumental (CLUE- EM/EM).....	61
5.1.1 Otimização das condições do detector.....	61
5.1.2 Otimização das condições cromatográficas	64
5.1.3 Seleção do solvente utilizado no preparo dos padrões	67
5.2 Preparo das amostras.....	68
5.2.1 Homogeneidade das amostras.....	68
5.2.2 Otimização do método de preparo das amostras.....	71
5.2.3 Seleção do solvente de diluição do extrato da amostra	74
5.3 Validação dos métodos analíticos	75
5.3.1 Seletividade.....	75
5.3.2 Efeito matriz	77
5.3.3 Linearidade.....	81
5.3.4 Exatidão e Precisão.....	81
5.3.5 Limite de detecção e Limite de quantificação	82
5.4 Análise das amostras.....	85
6 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS.....	99
APÊNDICE A - Resultados encontrados para as fumonisinas livres nas amostras de milho pipoca e produtos à base de milho (µg/kg) – Rio de Janeiro.....	120
APÊNDICE B - Resultados encontrados para as fumonisinas livres nas amostras de milho pipoca e produtos à base de milho (µg/kg) – PROMAC.	123
APÊNDICE C - Resultados para as fumonisinas B1 e B2 mascaradas encontradas nas amostras de milho pipoca e produtos à base de milho (µg/kg) – PROMAC.	127
APÊNDICE D - Resultados para as fumonisinas B1 e B2 totais (após hidrólise das amostras) encontradas nas amostras de milho pipoca e produtos à base de milho (µg/kg) – PROMAC.....	130

1 INTRODUÇÃO

Os efeitos da contaminação de alimentos por fungos são conhecidos há muito tempo. No decorrer dos séculos diversos surtos de intoxicação de animais e humanos devido ao consumo de alimentos contaminados por fungos, foram relatados. Um dos primeiros registros datam da Idade Média, quando a ingestão de centeio infectado pelo fungo *Claviceps purpurea* resultou na morte de centenas de pessoas. No entanto somente em 1960 após a morte de centenas de aves causada pela ingestão de amendoim contaminado por aflatoxinas foi despertado o interesse no estudo das micotoxinas (PERAICA et al., 1999).

Atualmente diversas substâncias químicas são classificadas como micotoxinas, produzidas como metabólitos secundários de espécies fúngicas toxígenas pertencentes principalmente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (ADEYEYE, 2016; NEME; MOHAMMED, 2017; WU; GROOPMAN; PESTKA, 2014). Dentre os alimentos com maior ocorrência de micotoxinas destacam-se o milho, trigo, arroz, amendoim, café, frutas frescas e secas, farinha de mandioca, vinho, cerveja, condimentos, leite e seus derivados (MAGAN; OLSEN, 2004).

O milho é um dos principais cereais cultivados no Brasil, com ampla distribuição do norte ao sul do país, constituindo parte essencial da base alimentar humana e sendo considerado de grande importância econômica. O Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de milho, sendo a maior parte dessa produção destinada à formulação de rações para a suinocultura e avicultura. A outra parcela da produção compõe a dieta da população através do seu consumo direto ou de produtos processados, como fubá e farinha de milho (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2011).

A qualidade dos grãos pode ser afetada por fatores climáticos, danos físicos, secagem, transporte e armazenamento inadequados, promovendo a presença de micotoxinas no milho, gerando altos índices de perda da qualidade dos grãos (MARQUES et al., 2009; STEFANELLO et al., 2012).

A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, podendo ocorrer durante o crescimento, colheita ou estocagem do alimento (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010). A exposição às micotoxinas acontece principalmente pela

ingestão, bem como por vias dérmicas e inalatórias (MARIN et al., 2013). Esta exposição está associada a diversas patologias que podem ocorrer em função das propriedades carcinogênicas, hepatotóxicas, nefrotóxicas e imunotóxicas dessas substâncias, podendo ocasionar sérios problemas sobre a saúde humana e animal. A gravidade desses efeitos depende da toxicidade, dose e frequência com que a micotoxina é ingerida, além do estado nutricional do indivíduo e dos possíveis efeitos sinérgicos com outros agentes químicos aos quais esse indivíduo está exposto (MAZIERO; BERSOT, 2010; PEREIRA; SANTOS, 2011).

As fumonisinas são as principais micotoxinas produzidas por espécies do gênero *Fusarium*, o principal gênero de fungos frequentemente associado aos grãos de milho (DUTTON, 2009; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2014; HERMANNNS et al., 2006). Diversos estudos têm demonstrado a ocorrência de altos níveis de contaminação de milho e produtos à base de milho por fumonisinas, inclusive em níveis superiores aos limites máximos tolerados pela regulamentação para controle de micotoxinas em alimentos no Brasil (CALDAS; SILVA, 2007; MARTINS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017; QUEIROZ et al., 2012; SAVI et al., 2016).

Os níveis de contaminação de fumonisinas encontrados em produtos à base de milho geralmente são menores que os encontrados no milho não processado. Assim, o processamento desses alimentos, principalmente utilizando altas temperaturas, tem sido considerado na redução dos níveis de contaminação dessas substâncias (BRYLA et al., 2014; MAGAN; OLSEN, 2004). No entanto, a contaminação encontrada para as fumonisinas pode estar sendo subestimada já que estas micotoxinas podem se ligar naturalmente a macromoléculas (proteínas e carboidratos) presentes no milho, bem como quando estes alimentos são submetidos a altas temperaturas no processamento. Estas substâncias têm sido incluídas entre as micotoxinas mascaradas. São classificadas como micotoxinas mascaradas, substâncias que não são detectadas empregando as metodologias analíticas de rotina utilizadas para análise de micotoxinas em alimentos, devido ao seu diferente comportamento químico em comparação às substâncias originais. Além disso, durante o processo de digestão gastrointestinal as micotoxinas mascaradas podem ser hidrolisadas, disponibilizando assim a micotoxina precursora (BERTHILLER et al., 2011; CIRLINI; DALL'ASTA; GALAVERNA, 2012; DALL'ERTA et al., 2013; FALAVIGNA et al., 2012; GAREIS et al., 1990).

Estudos têm demonstrado que a contaminação por fumonisinas mascaradas em produtos à base de milho pode ser semelhante ou até superior à concentração encontrada para a forma livre (DALL'ASTA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2015; SARTORI, 2015). Ainda há pouco conhecimento sobre a toxicidade, ocorrência e formação de fumonisinas mascaradas em alimentos. No entanto, considerando a possível conversão dessas substâncias para a forma precursora no sistema digestivo, a avaliação da exposição às fumonisinas pode estar sendo subestimada (CIRLINI; DALL'ASTA; GALAVERNA, 2012; GAREIS et al., 1990).

O atendimento às normas oficiais estabelecidas para o controle de micotoxinas em alimentos requer o uso de métodos analíticos confiáveis. Várias rotas analíticas têm sido empregadas para a determinação de micotoxinas em alimentos. Destaca-se nos últimos anos, a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM), bem como da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM) (CIGIC; PROSEN, 2009; KOPPEN et al., 2010; KRŠKA et al., 2008; SAEGER, 2011; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

Neste contexto, esse estudo teve por objetivo avaliar a ocorrência de fumonisinas livres e mascaradas em milho e produtos à base de milho. Métodos analíticos utilizando a técnica de CLUE-EM/EM foram desenvolvidos e validados para serem utilizados nesse estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICOTOXINAS

As micotoxinas são produzidas como metabólitos tóxicos por diversas espécies de fungos filamentosos, podendo contaminar alimentos destinados ao consumo animal e humano. São substâncias de baixo peso molecular, possuem diversas variações de estruturas químicas e são agrupadas de acordo com o grau e tipo de toxicidade. Estima-se que aproximadamente 25% dos produtos agrícolas produzidos anualmente no mundo estejam contaminados por micotoxinas (ATANDA et al., 2011; IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010; PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2014).

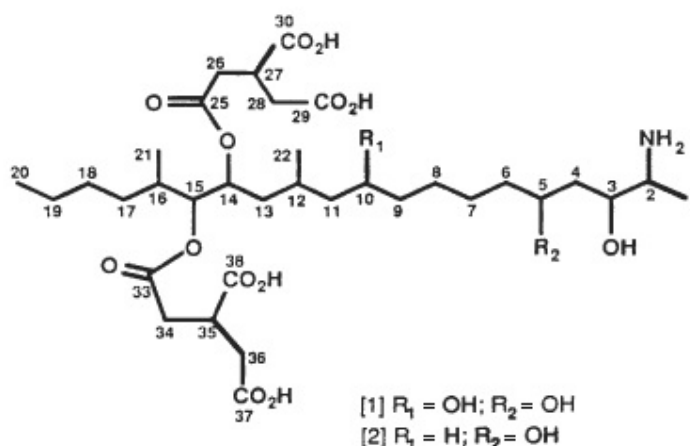
Os principais gêneros de fungos produtores de micotoxinas frequentemente associadas com a contaminação de alimentos são os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (MARIN et al., 2013). As espécies produzidas pelo gênero *Fusarium* geralmente ocorrem ainda no campo, enquanto as espécies produzidas pelos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* crescem com maior frequência nos alimentos em condições de armazenamento (BENNETT; KLICH, 2003; BERTHILLER; MARAGOS; DALL'ASTA, 2016). Mais de 300 micotoxinas já foram identificadas e relatadas, entretanto devido à toxicidade e ocorrência destacam-se as aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina (OTA), desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) (ATANDA et al., 2011; PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2014).

As fumonisinas são produzidas por diversas espécies de fungos do gênero *Fusarium*, principalmente pelas espécies *Fusarium proliferatum* e *Fusarium verticillioides*. São conhecidos pelo menos 28 análogos de fumonisinas, separados em quatro grupos principais A, B, C e P. Entre os análogos identificados até agora, as fumonisinas B1, B2 e B3 são as mais importantes toxicologicamente, sendo as fumonisinas B1 (FB1) e B2 (FB2) as formas mais abundantes presentes naturalmente em alimentos (GELDERBLOM et al., 2001; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002; VOSS; SMITH; HASCHEK, 2007).

As fumonisinas B1 e B2 tiveram suas estruturas químicas isoladas caracterizadas pela primeira vez em 1988, a partir de culturas de *Fusarium verticillioides* (BEZUIDENHOUT et al., 1988; GELDERBLOM et al., 1988).

A fumonisina B1 é descrita quimicamente como um diéster de propano-1, 2, 3-ácido tricarbóxico e 2-amino-12, 16-dimetil-3, 5, 10, 14, 15-pentahidroieicosano, já a fumonisina B2 é caracterizada pela ausência da hidroxila na posição C₁₀ (LINO; SILVA; PENA, 2006). As estruturas químicas das fumonisinas B1 e B2 são apresentadas na figura 1.

Figura 1- Estruturas químicas das fumonisinas B1 [1] e B2 [2].



Fonte: (Adaptado de LINO; SILVA; PENA, 2006).

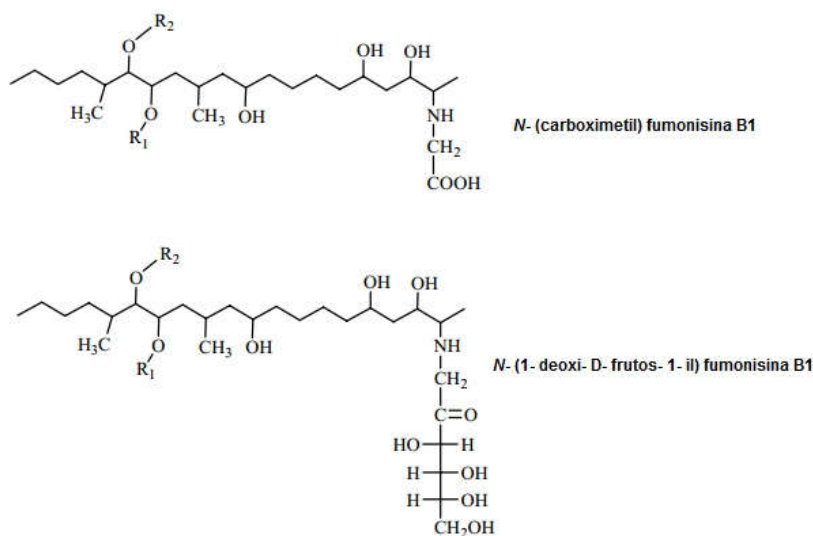
A fumonisina B1 é o análogo mais estudado do grupo das fumonisinas e está associada ao câncer de esôfago em humanos, leucoencefalomalácia em equinos (LEME), edema pulmonar em suínos e câncer hepático em ratos. Esta micotoxina foi descrita como o primeiro inibidor específico do metabolismo de esfingolipídios. O bloqueio da biossíntese de esfingolipídeos complexos causa o acúmulo de esfinganina e esfingosina, principal causa da toxicidade das fumonisinas, além de causar a inibição do crescimento celular e alteração do metabolismo lipídico de plantas e animais (DILKIN et al., 2003; KELLERMAN et al., 1990; MARASAS, 2001; MERRIL et al., 2001; WHO, 2000; WILSON; NELSON; KNEPP, 1985).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), há evidências experimentais suficientes que comprovam a carcinogenicidade desta micotoxina em animais. Já para humanos, as evidências da carcinogenicidade da fumonisina B1 são insuficientes, o que leva a classificação desta micotoxina como um possível carcinógeno humano (grupo 2B) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2002).

As fumonisinas são moléculas polares, solúveis em água, metanol e acetonitrila. São substâncias relativamente resistentes ao calor, suportando temperaturas de até 120 °C, podendo ser encontradas mesmo após o preparo de alimentos (HUMPF; VOSS, 2004; WHO, 2000). Diversos estudos avaliando a estabilidade de fumonisinas sob as condições de cozimento, torrefação, fritura, nixtamalização e extrusão foram reportados (BRYLA et al., 2014; BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; CASTELO et al., 1998; JACKSON et al., 1997; SAUNDERS; MEREDITH; VOSS, 2001). De acordo com os estudos citados, foi demonstrado que o preparo e processamento de alimentos podem reduzir as concentrações de fumonisinas, entretanto essa redução também pode estar associada a mudanças na estrutura química dessas substâncias.

O aquecimento da fumonisina B1 na presença de açúcares redutores pode levar à formação de complexos entre o grupamento amina da fumonisina e o açúcar redutor, formando produtos como *N*-(1-deoxi-D-frutos-1-il) fumonisina B1- (NDF-FB1) e *N*-(carboximetil) fumonisina B1- (NCM-FB1), que são substâncias menos tóxicas que a fumonisina B1 devido à modificação no grupamento amina da toxina (HOWARD et al., 1998; MANGIA, 2009; POLING; PLATTNER; WEISLEDER, 2002). As estruturas químicas de NCM-FB1 e NDF-FB1 são apresentadas na figura 2.

Figura 2- Estruturas químicas de NCM-FB1 e NDF-FB1.



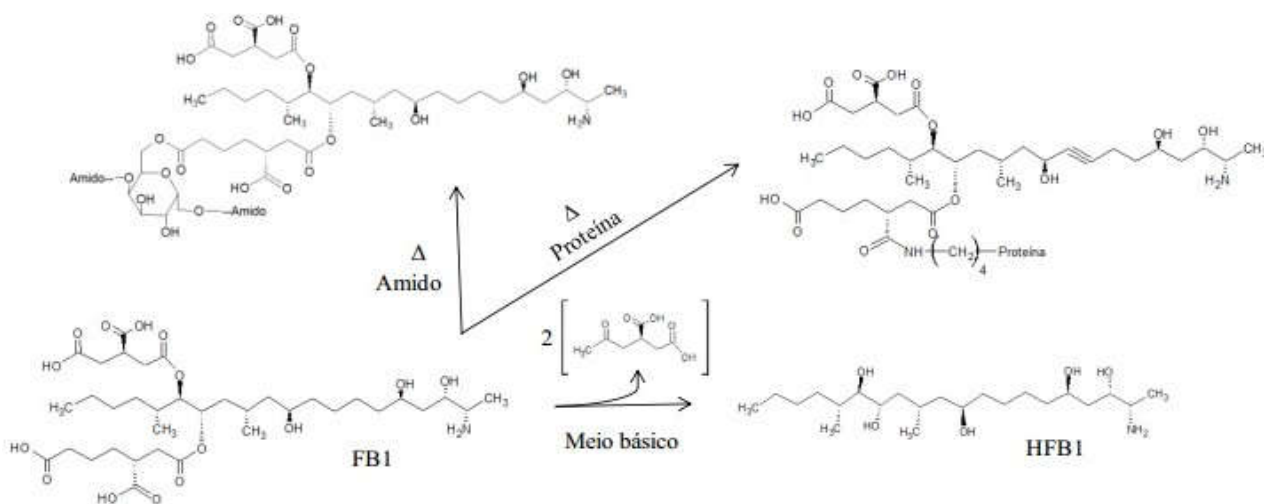
Fonte: (Adaptado de MANGIA, 2009).

As fumonisinas hidrolisadas (HFB's), descritas como os primeiros produtos de degradação das fumonisinas (FB's), podem ser formadas durante processos como a

nixtamalização (milho cozido em meio alcalino), onde ocorre a remoção das cadeias de ácidos tricarbóxicos (TCA) das estruturas das fumonisinas. Essas substâncias possuem uma relevância toxicológica relativamente mais baixa em comparação com a fumonisina B1 (HAHN et al., 2015; HUMPF; VOSS, 2004; SYDENHAM et al., 1995).

As fumonisinas também podem se ligar covalentemente a macromoléculas como proteínas e carboidratos presentes nos alimentos, através das cadeias laterais de ácido tricarbóxico (TCA) no processamento térmico desses alimentos. Estudos demonstram que as fumonisinas ligadas podem ser facilmente hidrolisadas em meio alcalino, liberando as cadeias laterais de ácido tricarbóxico da molécula de fumonisina (BRYLA et al., 2016; DALL'ASTA et al., 2009a; HUMPF; VOSS, 2004). As estruturas da fumonisina B1 livre, hidrolisada e ligada são apresentadas na figura 3.

Figura 3- Estruturas da fumonisina B1 livre, hidrolisada e ligada a macromoléculas.



Fonte: (Adaptado de ANDRADE, 2016).

2.2 OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS EM MILHO E PRODUTOS À BASE DE MILHO

A contaminação de milho e produtos à base de milho por fumonisinas tem sido reportada em diversos países do mundo. Em estudo realizado na Polônia por Bryla et al. (2016) com 88 amostras de produtos à base de milho (amido, macarrão, farinha, cereais matinais e salgadinhos), as fumonisinas B1, B2 e B3 foram encontradas em 57% das amostras analisadas em concentrações acima dos

respectivos limites de quantificação. Em estudo realizado na Tanzânia por Geary et al. (2016) com 101 amostras de mingau à base de milho, as fumonisinas B1 e B2 foram encontradas em 100% das amostras analisadas. Na Nigéria, as fumonisinas B1, B2 e B3 foram encontradas em 65% das 136 amostras de milho analisadas por Chilaka et al. (2016). Em estudo realizado com 67 amostras de milho e produtos à base de milho (milho amarelo, milho branco, cereais matinais, farinha, sêmola, amido e salgadinhos de milho) comercializados em Portugal, as fumonisinas B1 e B2 foram encontradas em 22,4% das amostras analisadas (SILVA et al., 2007). No Canadá, em estudo realizado por Park et al. (2004) com 30 amostras de produtos à base de milho (cereais matinais, cereais à base de milho e salgadinhos de milho), a fumonisina B1 foi encontrada em 47% das amostras. Em outro estudo realizado no Canadá com 25 amostras de cereais matinais, a fumonisina B1 foi encontrada em 88% das amostras analisadas (KIM; SCOTT; LAU, 2003). Em estudo realizado na Itália, Dall' Asta et al. (2009a) analisaram 40 produtos à base de milho (massas, pães, salgadinhos, farinhas e produtos extrudados) e encontraram fumonisinas B1, B2 e B3 em 90% das amostras analisadas. Em outro estudo realizado na Itália com 100 amostras de milho e produtos à base de milho (milho, produtos sem glúten, cereais matinais, fubá, farinha e salgadinhos de milho), as fumonisinas B1 e B2 foram encontradas em 62% das amostras analisadas (LO MAGRO et al., 2011). Em estudo realizado na África com 40 amostras de cereais e produtos de cereais à base de milho, a fumonisina B1 foi encontrada em 92,2% das amostras analisadas (DOKO et al., 1996). Na Espanha, em estudo realizado com 928 amostras de produtos à base de milho (cereais matinais, milho doce, salgadinhos, cerveja, cereais infantis, alimentos sem glúten, alimentos étnicos), a maior ocorrência de fumonisinas B1 e B2 foi encontrada em cerveja (90%), salgadinhos de milho (61%), alimentos étnicos (51%) e cereais matinais (39%) (SANCHO et al., 2012). Na tabela 1 são mostrados resumidamente os estudos reportados sobre a presença de fumonisinas em milho e seus produtos em diferentes países.

Tabela 1- Ocorrência de fumonisinas livres em milho e produtos à base de milho no mundo

Local/Referência	Matriz	Fumonisinas	Faixa de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Técnica	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Polônia (BRYLA et al., 2016)	Amido, macarrão, farinha, cereais matinais e salgadinhos.	(B1+B2+B3)	13-3297	CLAE-EM/EM	12,5
Tanzânia (GEARY et al., 2016)	Mingau à base de milho	B1 B2	13-1850 7-1287	CLAE-EM/EM	1 0,5
Nigéria (CHILAKA et al., 2016)	Milho não-processado	B1 B2 B3	ND-8222 ND -2885 ND -445	CLAE-EM/EM	16,4 23 28
Portugal (SILVA et al., 2007)	Milho amarelo, milho branco, cereais matinais, farinha, sêmola, amido e salgadinhos de milho.	B1 B2	ND -1569 ND -457	CLAE-EM/EM	20 15
Canadá (PARK et al., 2004)	Cereais matinais, cereais à base de milho e salgadinhos de milho.	B1 B2	13-237 21-23	CLAE-EM	--
Canadá (KIM; SCOTT; LAU, 2003)	Cereais matinais (corn flakes)	B1 B2	ND -198 ND -26	CLAE-EM	--
Itália (DALL'ASTA et al., 2009a)	Massas, pães, salgadinhos, farinhas e produtos extrudados.	(B1+B2+B3)	ND -3310	CLAE-EM/EM	5 (FB1 e FB2) 12 (FB3)
Itália (LO MAGRO et al., 2011)	Milho, produtos sem glúten, cereais matinais, fubá, farinha e salgadinhos de milho.	(B1+B2)	22-2309	CLAE-DF	13 (FB1) 16 (FB2)
África (DOKO et al., 1996)	Cereais à base de milho	B1 B2	ND -1910 ND -620	CLAE-DF	--
Espanha (SANCHO et al., 2012)	Cereais matinais, milho doce, salgadinhos, cerveja, cereais infantis, alimentos sem glúten, alimentos étnicos.	(B1+B2)	ND -682	CLAE-DF	11,7 (cerveja)/ 15,6 (alimentos sólidos)

Fonte: (Do autor, 2017).

LQ= limite de quantificação; ND= não detectado.

No Brasil, as fumonisinas têm sido as micotoxinas encontradas com maior ocorrência em milho e produtos à base de milho, sendo relatadas em diversos estudos. Essas micotoxinas foram encontradas em cerca de 50% de 81 amostras de produtos à base de milho (farinha de milho, farinha de milho pré-cozida, canjica, grits de milho e milho pipoca) comercializados na cidade de Campinas, SP (MACHINSKI; SOARES, 2000) e em 100% de 60 amostras de farinha de milho e fubá comercializados na cidade de São Paulo (BITTENCOURT et al., 2005). Em outro estudo realizado em São Paulo com 120 amostras de fubá, farinha de milho, cereais matinais e milho pipoca, mais de 70% das amostras analisadas apresentaram contaminação por fumonisina B1 (BORDIN et al., 2014). Em Santa Catarina, em estudo realizado com 82 amostras de fubá, flocos de milho, canjica e milho pipoca, 93% das amostras analisadas apresentaram contaminação por fumonisinas B1 e B2 (SCAFF; SCUSSEL, 2004). Em outro estudo realizado em Santa Catarina, as fumonisinas B1 e B2 foram encontradas respectivamente em 71,6% e 50,5% do total (n= 95) de amostras de milho pipoca e produtos à base de milho analisados (SAVI et al., 2016). No Distrito Federal, as fumonisinas B1 e B2 foram encontradas em 81% e 71,6% respectivamente, de 208 amostras de produtos à base de milho (milho pipoca, fubá, creme de milho, milho doce, salgadinhos de milho) analisadas (CALDAS; SILVA, 2007). Em estudo realizado com 74 amostras de milho pipoca, canjica, farinha de milho, flocos de milho pré-cozidos, fubá, quirera e quirera fina adquiridas no comércio da cidade de Recife (PE), a fumonisina B1 foi encontrada em 94,6% das amostras analisadas (KAWASHIMA; SOARES, 2006). Em estudo realizado no Paraná com amostras de fubá, grãos de milho, milho pipoca, farinha de milho e cereais matinais, as fumonisinas B1 e B2 foram encontradas respectivamente em 82% e 51% do total (n= 100) de amostras analisadas (MARTINS et al., 2012). Em estudo realizado com 214 amostras de milho não-processado provenientes de diversas regiões do país, 99% das amostras analisadas apresentaram contaminação por fumonisina B1 (VARGAS et al., 2001). Em Minas Gerais, as fumonisinas B1 e B2 foram encontradas em 100% de 40 amostras de milho provenientes de agricultores familiares (QUEIROZ et al., 2012). No Rio Grande do Sul, Oliveira e colaboradores avaliaram a ocorrência de fumonisinas B1 e B2 em 72 amostras de milho não-processado; as fumonisinas foram encontradas em 90% das amostras analisadas. Em outro estudo realizado no Sul do Brasil com amostras de grãos de milho provenientes de fazendas de agricultores, as fumonisinas B1 e B2 foram

encontradas em 100% do total (n= 148) de amostras analisadas (OLIVEIRA et al., 2015, 2017). Na tabela 2 são mostrados resumidamente os estudos nacionais realizados em milho, milho pipoca e produtos à base de milho.

Tabela 2- Ocorrência de fumonisinas livres em milho, milho pipoca e produtos à base de milho no Brasil.

Local/Referência	Matriz	Fumonisinas	Faixa de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Técnica	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Campinas (MACHINSKI; SOARES, 2000)	Farinha de milho, farinha de milho pré-cozida, pamonha, curau, canjica, grits de milho e milho pipoca.	B1 B2	30-4930 20-1380	CLAE-DF	--
São Paulo (BITTENCOURT et al., 2005)	Farinha de milho e fubá.	B1 B2	470-15290 120-3940	CLAE-DF	20 30
São Paulo (BORDIN et al., 2014)	Fubá, farinha de milho, cereais matinais e milho de pipoca	B1	33-1209	CLAE-DF	100
Santa Catarina (SCAFF; SCUSSEL, 2004)	Fubá, flocos de milho, canjica e milho pipoca.	(B1+B2)	ND -21800	CLAE-DF	--
Santa Catarina (SAVI et al., 2016)	Grãos de milho, farinha de milho, fubá, grits de milho, cereais matinais e milho pipoca.	B1 B2	15-5439 32-1481	CLAE-DF	12,5 31,3
Distrito Federal (CALDAS; SILVA, 2007)	Milho pipoca, fubá, creme de milho, milho doce e salgadinhos de milho.	(B1+B2)	ND -6170	CLAE-DF	20
Recife (KAWASHIMA; SOARES, 2006)	Milho de pipoca, canjica, farinha de milho, flocos de milho pré-cozidos, fubá, quirera e quirera fina.	B1	ND -8600	CLAE-DF	12
Paraná (MARTINS et al., 2012)	Fubá, grãos de milho, milho de pipoca, farinha de milho e cereais matinais.	B1 B2	81-3462 45-886	CLAE-DF	78,1 43,1
Regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste do Brasil (VARGAS et al., 2001)	Milho não-processado	B1	200-6100	CCD	--
Minas Gerais (QUEIROZ et al., 2012)	Milho não-processado	(B1+B2)	230-6450	CLAE-DF	--
Região Sul do Brasil (OLIVEIRA et al., 2015)	Milho não-processado	(B1+B2)	--	CLAE-EM/EM	125
Região Sul do Brasil (OLIVEIRA et al., 2017)	Milho não-processado	(B1+B2)	62,4-66274	CLAE-EM/EM	--

Fonte: (Do autor, 2017).

LQ= limite de quantificação; ND= não detectado.

2.3 Regulamentação para fumonisinas em milho e produtos à base de milho

A definição de limites máximos toleráveis (LMT) para micotoxinas envolve diversos fatores, como a ocorrência de micotoxinas em alimentos, dados toxicológicos disponíveis para estudos de avaliação de risco e metodologias analíticas adequadas ao controle de micotoxinas, além de fatores socioeconômicos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2004; MAGAN; OLSEN, 2004).

A regulamentação de micotoxinas estabelecida para milho era restrita às aflatoxinas (B1 + B2 + G1 + G2), com LMT de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ estabelecido pelo Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária na Portaria nº 183 de 21 de março de 1996 (BRASIL, 1996). Posteriormente o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas, instituído pelo Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estabeleceu o LMT de 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório de fumonisinas B1 e B2 em grãos de milho e subprodutos destinados à alimentação animal (BRASIL, 2006).

Em 18 de fevereiro de 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou a Resolução RDC nº 07, contemplando um maior número de micotoxinas e alimentos na legislação brasileira, incluindo fumonisinas em milho, milho pipoca e produtos derivados (BRASIL, 2011).

As fumonisinas têm sido as principais micotoxinas regulamentadas em milho e produtos à base de milho. A RDC nº 07 estabeleceu limites para o somatório das fumonisinas B1 e B2 em milho pipoca, alimentos à base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância), farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha, amido de milho, outros produtos à base de milho e milho em grão para posterior processamento. Os limites estabelecidos são mostrados na tabela 3.

Tabela 3- Limites máximos toleráveis para fumonisinas em milho, milho pipoca e produtos à base de milho no Brasil.

Micotoxina	Alimento	LMT ($\mu\text{g kg}^{-1}$) até	Legislação até	LMT ($\mu\text{g kg}^{-1}$) após	Legislação após	LMT ($\mu\text{g kg}^{-1}$) após	Legislação após
		31/12/2016	31/12/2016	01/01/2017	01/01/2017	01/01/2019	01/01/2019
Fumonisinas (B1 + B2)	Milho de pipoca	2000	RDC N° 7/2011	2000	RDC N° 7/2011	2000	RDC N° 7/2011
	Alimentos à base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância).	200		200		200	
	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha.	2500		1500	RDC N° 138/2017	1500	RDC N° 138/2017
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	2000		1000		1000	
	Milho em grão para posterior processamento.	--		5000		5000	

Fonte: (BRASIL, 2011, 2017).

Os valores referentes à legislação até 31/12/2016 representam os valores que estão nos anexos I e II da RDC N° 7/2011. Em janeiro de 2017 entraram em vigor os valores estabelecidos pela RDC N° 138/2017 para fumonisinas em farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha, amido de milho, milho em grão para posterior processamento e outros produtos à base de milho no Brasil.

A Comunidade Europeia também possui regulamentação para fumonisinas em milho e produtos à base de milho. Entretanto, os LMT estabelecidos para milho não processado e alimentos à base de milho, são menores que os limites estabelecidos no Brasil, exceto em alimentos à base de milho para alimentação infantil, nos quais os limites estabelecidos pelas duas legislações são os mesmos. Os valores estabelecidos pela Comunidade Europeia por meio do regulamento (CE) N° 1881/2006, são apresentados na tabela 4.

Tabela 4- Limites máximos de fumonisinas tolerados pela Comunidade Europeia em milho e produtos à base de milho.

LMT Comunidade Europeia (2006)	
Alimentos	Micotoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (FB1 + FB2)
Milho não transformado	2000
Farinha de milho, sêmola de milho, grits, gérmen de milho e óleo de milho refinado.	1000
Alimentos à base de milho para consumo humano direto com exceção dos anteriores.	400
Alimentos transformados à base de milho e alimentos para bebês destinados a lactentes e crianças.	200

Fonte: (CE, 2006a).

Nos Estados Unidos, a recomendação para o somatório das fumonisinas B1, B2 e B3 em milho pipoca é de $3000 \mu\text{g kg}^{-1}$; para produtos à base de milho degerminado (grits, fubá, farinha de milho) o limite estabelecido é de $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (NGFA, 2011). Em nível internacional, em 2014, o *Codex Alimentarius* estabeleceu um limite de $4000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fumonisinas (B1 + B2) em grãos de milho não processados, e de $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fubá e farinha de milho (FOOD AND

AGRICULTURE ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

2.4 Micotoxinas mascaradas

Nos últimos anos, tem sido abordada com cada vez mais importância a ocorrência das micotoxinas que se encontram conjugadas ou ligadas a outras moléculas, geradas no metabolismo de plantas, fungos ou durante o processamento térmico de alimentos, podendo coexistir com as micotoxinas nativas (GALAVERNA et al., 2009). São designadas como “micotoxinas mascaradas” as micotoxinas que não são detectadas por metodologias analíticas convencionais devido a mudanças em sua estrutura química original, podendo sofrer hidrólise durante o processo de digestão gastrointestinal e disponibilizando assim, a micotoxina precursora (BERTHILLER et al., 2011; CIRLINI; DALL’ASTA; GALAVERNA, 2012; DALL’ERTA et al., 2013; GAREIS et al., 1990).

Embora essas substâncias apresentem menor toxicidade do que as micotoxinas precursoras, as micotoxinas mascaradas subestimam a concentração de micotoxinas encontradas, podendo contribuir de maneira significativa com teor total de micotoxinas nos alimentos e subestimando também a exposição total do consumidor (FALAVIGNA et al., 2012).

2.4.1 Formação e ocorrência de micotoxinas mascaradas

A expressão micotoxinas mascaradas (do inglês: *masked mycotoxins*) foi utilizada pela primeira vez na década de 1990. No entanto, estas substâncias foram descobertas em meados dos anos 1980, a partir de observações da ocorrência de micotoxicoses em animais pelo consumo de rações contaminadas por zearalenona com níveis de contaminação incompatíveis aos efeitos observados (GAREIS et al., 1990).

As micotoxinas mascaradas compreendem as formas conjugadas extraíveis (do inglês: *conjugated mycotoxins*) como também as formas ligadas não-extraíveis (do inglês: *hidden* ou *bound mycotoxins*). As micotoxinas conjugadas são formadas por ligações covalentes (grupamentos sulfatos, glicosídeos e aminoácidos) no metabolismo de plantas e fungos. Já as formas ligadas ou associadas à matriz, ocorrem por ligações covalentes ou não covalentes às macromoléculas (proteínas e

carboidratos poliméricos) presentes no alimento (BERTHILLER et al., 2009; CIRLINI; DALL'ASTA; GALAVERNA, 2012; DALL'ASTA et al., 2009b).

No metabolismo de plantas, as micotoxinas conjugadas são formadas como um mecanismo de desintoxicação. As plantas possuem uma elevada capacidade de transformar compostos xenobióticos e fitotóxicos, através de uma variedade de reações enzimáticas. Os processos utilizados pelas plantas para detoxificar herbicidas e agrotóxicos são os mesmos processos metabólicos utilizados para todos os outros xenobióticos, incluindo as micotoxinas (BERTHILLER et al., 2007). As micotoxinas conjugadas geralmente são substâncias mais polares e menos tóxicas do que as micotoxinas precursoras (COLEMAN et al., 1997). Diferente das micotoxinas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, infecções causadas por *Fusarium* normalmente ocorrem no campo tornando as micotoxinas desoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), fumonisina (FB1), toxina T-2 (T2) e toxina HT-2 (HT2), mais suscetíveis à conjugação no metabolismo das plantas (BERTHILLER et al., 2016).

A hipótese de micotoxinas conjugadas de desoxinivalenol pelo metabolismo de plantas em alimentos foi reportada no início dos anos 1980 por Miller e Young (1983) e Scott et al. (1984). Posteriormente em estudo realizado por Sewald et al. (1992), o principal metabólito conjugado de DON formado no metabolismo de plantas, desoxinivalenol-3-glicosídeo (D3G), foi isolado de culturas de células de milho tratadas com DON, e encontrado pela primeira vez em estudo realizado por Berthiller et al. (2005) em milho e trigo naturalmente contaminados. Recentemente, outros estudos demonstraram que além de D3G, outros conjugados de DON também estavam presentes em cereais e produtos à base de cereais. Em estudo realizado por Zachariasova et al. (2012), conjugados oligoglicosilados de DON foram encontrados em produtos à base de cereais naturalmente contaminados. Uma triagem indireta para detecção de produtos da biotransformação de DON no trigo, descreveu pela primeira vez o conjugado DON-glutationa (DON-GSH), incluindo seus correspondentes produtos de degradação DON-S-cisteína e DON-S-cisteinil-glicina (KLUGER et al., 2013). Foi reportada também a identificação de desoxinivalenol-15-sulfato (D15S), desoxinivalenol-3-sulfato (D3S), DON-15-glicosídeo (D15G) e 15-acetil-DON-3-sulfato (15-ADON3S) como novos metabólitos conjugados de DON em trigo artificialmente contaminado (SCHMEITZL et al., 2015; WARTH et al., 2015). A ocorrência dos conjugados 15-acetil-DON-3-glicosídeo (15-ADON3G), DON-malonil-glicosídeo e DON-di-hexosídeo também foi reportada como

produtos formados na desintoxicação de plantas (KLUGER et al., 2015).

Os principais conjugados de zearalenona formados no metabolismo de plantas são zearalenona-4-glicosídeo (ZEA-4G), alfa e beta-zearalenol-4-glicosídeo (α -ZEL-4G e β -ZEL-4G), respectivamente ZEA-14G, α -ZEL-14G e β -ZEL-14G conforme atual nomenclatura da IUPAC (BERTHILLER et al., 2009; ENGELHARDT et al., 1999; METZLER, 2011). A presença dessas substâncias foi reportada em estudo realizado por Vendl et al. (2010) em produtos à base de cereais incluindo cerveja, e em estudo reportado por De Boevre et al. (2012) em cereais e alimentos à base de cereais naturalmente contaminados. Mais recentemente, a identificação e confirmação de zearalenona-16-O- β -glicosídeo como uma nova micotoxina mascarada, foram relatadas em cevada e culturas de células de trigo artificialmente contaminados (PARIS et al., 2014).

Metabólitos designados como fusarenona-x-glicosídeo e nivalenol-glicosídeo foram reportados pela primeira vez em grãos de trigo artificialmente contaminados (NAKAGAWA et al., 2011). Novos conjugados glicosilados de fumonisinas, identificados como N-(1-deoxi-(D)-frutose) fumonisina B2 e N-(1-deoxi-(D)-frutose) fumonisina B3, foram reportados e sugeridos como metabólitos glicosilados de plantas (MATSUO et al., 2015). A existência de derivados glicosilados das toxinas T-2 e HT-2 em plantas, bem como a existência de neosolaniol-glicosídeo e diacetoxyscirpenol-glicosídeo, também foi confirmada em estudo com milho artificialmente contaminado (NAKAGAWA et al., 2013a, 2013b).

A capacidade das plantas metabolizarem ocratoxina A (OTA), uma micotoxina encontrada com grande ocorrência em café, foi reportada por Rhuland et al. (1996a) e por Rhuland et al. (1996b) em estudos que demonstraram a formação de diversos conjugados da micotoxina em culturas de células de plantas como cereais e legumes artificialmente contaminados. Posteriormente em outro estudo realizado por Rhuland et al. (1997) foi relatada a presença de conjugados de OTA em vegetais e cereais em germinação; os principais metabólitos encontrados foram os isômeros 4-hidroxi-ocratoxina A (I) e (II) e os isômeros 4-hidroxi-ocratoxina A- β -glicosídeo (I) e (II).

Algumas micotoxinas conjugadas podem ser formadas a partir de suas absorções ainda na forma livre, por células fúngicas como fontes de carbono, sendo excretadas diretamente pelos fungos. A produção de micotoxinas pode ser reduzida quando fungos micotoxigênicos e fungos não micotoxigênicos são cultivados ao mesmo tempo. Durante o cultivo destes fungos, os fungos não micotoxigênicos

competem com os fungos micotoxigênicos reduzindo o crescimento das espécies micotoxigênicas. Além disso, as espécies não micotoxigênicas podem absorver e converter metabolicamente a micotoxina produzida pelas espécies micotoxigênicas a outras substâncias (KAMIMURA et al., 1986; TSURUTA et al., 1977). As principais substâncias conhecidas que podem ser formadas no metabolismo de fungos são zearalenona-14-glicosídeo (ZEA-14G), zearalenona-14-sulfato (ZEA-14S), zearalenona-14,16-di-glicosídeo, 3-acetil-desoxinivalenol (3ADON) e 15-acetil-desoxinivalenol (15 ADON) (BERTHILLER et al., 2009). A presença de conjugados acetilados de DON, bem como as formas sulfatadas e glicosiladas de ZEA foi reportada por Gorst-Allman, Steyn e Vleggaar (1985), Kamimura et al. (1986), El-Sharkawy et al. (1991) e mais recentemente por Brodehl et al. (2014) que descreveu alfa-zearalenol-sulfato (α -ZEL-S) e zearalenona-16-glicosídeo (ZEA-16G) pela primeira vez em culturas de fungos.

A formação de metabólitos glicosilados das toxinas T-2 e HT-2 no metabolismo de fungos e possivelmente também de plantas, foi reportada pela primeira vez em estudo realizado por Busman, Poling e Maragos (2011) e posteriormente em estudo realizado por Lattanzio et al. (2012) em culturas de fungos como também em trigo, aveia, milho e arroz artificialmente contaminados. Recentemente, derivados mascarados formados pela esterificação da fumonisina B1 com os ácidos oleico e linoleico, foram detectados pela primeira vez em culturas de *Fusarium verticillioides* e milho não processado. No entanto, não está totalmente claro se essas substâncias são formadas no metabolismo de fungos ou plantas (EFSA, 2014; FALAVIGNA et al., 2013).

O processamento de alimentos também tem sido considerado um importante mecanismo para a formação de micotoxinas mascaradas, principalmente de fumonisinas. Alguns estudos também apontam a possível formação de micotoxinas ligadas de DON e OTA.

A possível formação de micotoxinas ligadas para DON durante o tratamento térmico foi demonstrada por Neira et al. (1997), onde foi observada uma redução dos níveis de concentração de DON no processo de panificação. Em outro estudo realizado por Bretz et al. (2006), a degradação das concentrações de DON sob tratamento térmico também foi reportada. Entretanto, ainda não está claro se essa redução é resultante de decomposições da micotoxina ou de ligações entre DON e macromoléculas (proteínas e carboidratos) presentes na matriz (KUSHIRO, 2008).

Mais recentemente, em estudo realizado por Bittner et al. (2013), em café artificialmente contaminado, também foi demonstrado que a ocratoxina A pode se ligar a polissacarídeos presentes no café, por esterificação à temperatura de torrefação.

Em relação as fumonisinas, apenas duas micotoxinas conjugadas (N-1-deoxi-(D)-frutose-FB1 e N-carboximetil-FB1) foram identificadas até o momento em produtos à base de milho submetidos ao processamento em altas temperaturas ou quando a fumonisina B1 é aquecida na presença de açúcares redutores (FALAVIGNA et al., 2012; HOWARD et al. 1998; POLING et al. 2002). Além disso, dependendo das condições utilizadas durante o processamento de alimentos as fumonisinas podem se ligar através de ligações covalentes a macromoléculas presentes na matriz (BRYLA et al., 2014, 2016; DALL'ASTA et al., 2008; MECA et al., 2010; PARK et al., 2004; SEEFELDER et al., 2003). Apesar de ser considerado o principal processo de formação de fumonisinas ligadas, recentemente verificou-se a formação de fumonisinas ligadas por ligações não covalentes em milho não processado evidenciando que outros mecanismos podem influenciar na formação destas micotoxinas mascaradas (DALL'ASTA et al., 2008, 2009a, 2009b; OLIVEIRA et al., 2015).

Grande parte dos estudos realizados tem se dedicado a descobrir novos metabólitos mascarados, bem como compreender os mecanismos envolvidos em suas formações. Destacam-se as micotoxinas zearalenona, desoxinivalenol e fumonisinas, produzidas por fungos do gênero *Fusarium*.

2.4.2 Conversão das micotoxinas mascaradas para as formas livres e importância toxicológica

De acordo com a literatura, as micotoxinas mascaradas apresentam menor toxicidade em relação às micotoxinas precursoras. No entanto, a possível conversão dessas substâncias no trato gastrointestinal libertando a micotoxina precursora tem sido demonstrada em diversos estudos *in vivo* e *in vitro*.

A conversão de ZEA-14G à ZEA no metabolismo de suínos foi relatada pela primeira vez por Gareis et al. (1990). Posteriormente em estudo *in vivo* realizado por Versilovskis et al. (2012), a conversão de ZEA-14G à sua forma livre foi claramente demonstrada em ratos. Recentemente, um estudo elaborado por Binder et al. (2017)

demonstrou a completa hidrólise de ZEA-14S, ZEA-14G e ZEA-16G no trato gastrointestinal de suínos, contribuindo para toxicidade geral de ZEA. Em estudo *in vitro* realizado por Dellafiora et al. (2017) com sangue bovino e componentes sanguíneos (plasma, soro e albumina sérica), a conversão de ZEA-14G à ZEA foi observada em todas as matrizes estudadas. A deglicosilação e absorção de ZEA-14G e ZEA-16G também foram avaliadas por Cirlini et al. (2016) utilizando monocamadas polarizadas de células Caco-2 intestinais humanas. De acordo com o estudo, ZEA-14G e ZEA-16G podem atravessar a barreira celular e serem absorvidas pelas células Caco-2, além de suas respectivas clivagens e subsequente liberação de ZEA para a forma precursora.

Em estudo *in vivo* realizado por Nagl et al. (2012), o metabolismo de D3G foi avaliado em ratos, demonstrando a hidrólise de D3G à DON. Em outro estudo *in vivo* realizado por Nagl et al. (2014) avaliando o metabolismo de D3G em suínos, foi demonstrado que a maior parte de D3G administrado oralmente aos animais, foi excretada nas formas de DON. De acordo com os autores dos estudos realizados, devido às baixas concentrações encontradas para D3G nas amostras analisadas, o mesmo é pouco biodisponível em ratos e suínos, possuindo uma relevância toxicológica consideravelmente menor do que DON. Resultados semelhantes foram encontrados por Warth et al. (2013) em estudo *in vivo* com seres humanos, onde um voluntário consumiu uma dieta naturalmente contaminada com DON e seus conjugados, e nenhuma forma mascarada foi detectada nas amostras de urina analisadas. Segundo o autor, a baixa biodisponibilidade das formas conjugadas pode estar relacionada à liberação das micotoxinas livres no organismo. Estudos *in vivo* realizados recentemente avaliaram a biodisponibilidade e hidrólise de 3ADON, 15ADON e D3G em frangos e suínos. Foi demonstrado a hidrólise das frações absorvidas de 3ADON e 15ADON para DON livre em frangos e suínos, no entanto, a hidrólise de D3G em DON só foi observada em suínos (BROEKAERT et al., 2015, 2017).

A alta capacidade da conversão de D3G em DON por bactérias específicas presentes no intestino foi demonstrada em estudo *in vitro* (BERTHILLER et al., 2011). A liberação dos conjugados D3G, ZEA-14G e ZEA-14S sob condições digestivas e fermentação intestinal *in vitro* também foi demonstrada por Dall'Erta et al. (2013). Os resultados do estudo sugerem que D3G, ZEA-14G e ZEA-14S são rapidamente desconjugados na flora intestinal, o que segundo os autores, pode

prejudicar as células epiteliais locais devido à toxicidade da micotoxina precursora libertada.

Efeitos citotóxicos individuais e combinados da co-ocorrência de DON e seus derivados conjugados em células epiteliais gástricas humanas, foram avaliados. O derivado acetilado 3ADON demonstrou menor toxicidade em comparação com DON, enquanto 15ADON demonstrou ser mais potente do que DON na indução de efeitos adversos na barreira epitelial intestinal humana. D3G não demonstrou evidências de toxicidade (ALIZADEH et al., 2016).

A bioacessibilidade da fumonisina B1 ligada, após a digestão *in vitro* com amostras de cereais matinais foi avaliada por Motta e Scott (2007, 2009). Em estudo reportado em 2007, após o tratamento das amostras sob condições gástricas, foi observado que não houve contribuição de fumonisinas ligadas a porcentagem de fumonisina B1 livre encontrada no quimo analisado. Posteriormente outro estudo foi realizado em 2009, entretanto quando o quimo foi hidrolisado, a presença de fumonisinas ligadas foi detectada. Segundo os autores, a fumonisina B1 ligada pode ser absorvida pelo intestino delgado, como também pode servir como substrato para bactérias intestinais, libertando a fumonisina B1 livre e aumentando a possibilidade de exposição à micotoxina precursora. Já em estudo realizado por Dall'Asta et al. (2010), um modelo de digestão *in vitro* de milho não processado demonstrou a conversão de fumonisinas ligadas à fumonisinas livres no trato gastrointestinal, confirmando que as enzimas digestivas são capazes de destruir as interações entre a matriz e a micotoxina. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizado por Falavigna et al. (2012) na avaliação da digestão *in vitro* de produtos à base de milho, confirmando a conversão de fumonisinas ligadas às formas precursoras no trato gastrointestinal.

De acordo com estudos reportados na literatura, o grupamento amino primário é responsável pela maior parte da ação tóxica das fumonisinas livres, o que sugere que seus derivados exerçam uma baixa toxicidade comparada à micotoxina precursora (FERNÁNDEZ-SURUMAY et al., 2004; GELDERBLOM et al., 1993; NORRED et al., 2001). Em estudo realizado por Hahn et al. (2015), após a administração oral de N-1-deoxi-(D)-frutose-FB1-(NDF) em ratos, foi observado uma clivagem parcial de NDF para fumonisina B1 durante a digestão, entretanto a porcentagem de fumonisina B1 liberada foi excretada principalmente nas fezes, sem interferência no metabolismo esfingolipídico dos ratos. Resultados semelhantes

foram encontrados por Cirlini et al. (2014) na avaliação de NDF no processo de digestão e fermentação do intestino humano. Foi observado uma clivagem parcial de NDF na digestão *in vitro* e estabilidade em relação à flora intestinal, entretanto, segundo os autores deve-se considerar a baixa importância toxicológica dessa substância devido à sua baixa ocorrência em alimentos.

Até o momento são escassas na literatura informações toxicológicas sobre as micotoxinas mascaradas (DALL'ERTA et al., 2013; DE BOEVRE; GRANICZKOWSKA; SAEGER, 2015; GRATZ et al., 2017). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado a conversão dessas substâncias para a forma precursora no trato gastrointestinal indicando que as micotoxinas mascaradas podem ser consideradas como uma ameaça à saúde (DELLAFIORA; DALL'ASTA, 2016), sendo essencial o apoio dos órgãos reguladores no desenvolvimento de pesquisas sobre a relevância toxicológica dessas substâncias para que regulamentos sejam estabelecidos.

2.5 Métodos analíticos para a determinação de micotoxinas e micotoxinas mascaradas em alimentos

Diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para determinação e/ou identificação de micotoxinas e micotoxinas mascaradas em alimentos. Destaca-se a grande utilização das técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-EMAR), cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), como também, cromatografia a gás com detector por ionização em chama (DIC) e captura de elétrons (CG-DCE) (CIRLINI; DALL'ASTA; GALAVERNA, 2012; MALACHOVÁ et al., 2015a; NAKAGAWA et al., 2011, 2013a, 2013b)

As principais micotoxinas mascaradas conhecidas são formadas por meio de conjugações com substâncias de baixo peso molecular, resultando em derivados com propriedades físico-químicas adequadas à análise direta por cromatografia líquida, como exemplo as formas conjugadas de ZEA e DON, que apresentam maior polaridade em relação aos seus precursores. A CLAE-EM/EM é considerada uma poderosa ferramenta analítica, com alta sensibilidade e seletividade. Esta técnica tem sido amplamente utilizada na determinação de micotoxinas e, mais recentemente, micotoxinas mascaradas, permitindo a análise direta de micotoxinas e

seus conjugados polares sem a necessidade de derivatização (BERTHILLER et al., 2007, 2013; CIRLINI; DALL'ASTA; GALAVERNA, 2012; NAKAGAWA et al., 2011). A CLAE-EMAR, empregando principalmente analisadores de massas como tempo de voo (*time-of-flight*, TOF) ou Orbitrap (armadilha de íons de Kingdon – Kingdon trap), tem sido a técnica de escolha na identificação de novas micotoxinas mascaradas (CIRLINI; DALL'ASTA; GALAVERNA, 2012; NAKAGAWA et al., 2011, 2013a, 2013b; ZACHARIASOVA et al., 2012). Esta técnica também tem sido utilizada para avaliar a contaminação de alimentos por micotoxinas e micotoxinas mascaradas em métodos de *screening* (KLUGER et al., 2013).

A CG tem sido utilizada com menor frequência na determinação de micotoxinas, principalmente devido à característica polar dessas substâncias, sendo necessário incluir etapas de derivatização no processo de tratamento das amostras (CARRASCO et al., 2014, 2015; KHARANDI et al., 2013). A alta polaridade das micotoxinas conjugadas impede a análise dessas substâncias por essa técnica mesmo após a inclusão de etapas de derivatização. Por este motivo, CG-EM tem sido empregada apenas na determinação indireta de micotoxinas mascaradas de DON (TRAN; SMITH, 2011; TRAN; SMITH; GIRGIS, 2011).

Diversos métodos de tratamento de amostra para a determinação simultânea de micotoxinas e micotoxinas mascaradas em alimentos têm sido desenvolvidos. Esses são baseados em métodos tradicionalmente utilizados na determinação de micotoxinas. Devido à alta seletividade e sensibilidade das técnicas analíticas empregadas, os métodos de tratamento de amostra desenvolvidos geralmente possuem poucas etapas de processamento baseando-se, principalmente, na extração seguida de diluição dos extratos das amostras (NATHANAIL et al., 2015; TOLOSA et al., 2017; WARTH et al., 2015).

Apesar de caracterizadas quimicamente, até o momento poucos padrões analíticos das micotoxinas conjugadas já conhecidas são disponíveis comercialmente desencorajando a realização de estudos de monitoramento. Pelo nosso conhecimento apenas o D3G e os acetilados de DON estão disponíveis comercialmente. Para suprir essa carência alguns laboratórios têm sintetizado ou isolado os conjugados de amostras naturalmente contaminadas para utilizá-los como padrões analíticos na calibração dos equipamentos (BERTHILLER et al., 2013, 2016).

Os procedimentos de extração e *clean up* utilizados para determinação de

micotoxinas mascaradas de DON e ZEA foram estudados por Vendl et al. (2009). Diferentes proporções da mistura dos solventes de extração acetonitrila/água, bem como a influência do pH na eficiência de extração foram estudadas. A mistura de acetonitrila/água/ácido acético na razão de 79/20/1 foi adequada para extração de todas as micotoxinas estudadas. Determinações simultâneas de ZEA, DON e seus metabólitos mascarados em alimentos à base de cereais com as mesmas proporções de solventes acetonitrila/água/ácido acético, também foram relatadas por Vendl et al. (2010); Em estudos realizados por De Boevre et al. (2012, 2013) e Nathanail et al. (2015), a determinação simultânea de DON, ZEA, toxina T-2, toxina HT-2, α -ZEA, β -ZEA, nivalenol, juntamente com seus metabólitos mascarados em milho, trigo, aveia, cereais, pão e produtos à base de cereais foi demonstrada. As extrações realizadas com acetonitrila/água/ácido acético nas mesmas proporções de 79/20/1 seguidas pela adição de hexano, também foram adequadas para todas as micotoxinas estudadas.

Como visto anteriormente, diversas micotoxinas conjugadas já foram identificadas. No entanto, a indisponibilidade de padrões analíticos para esses contaminantes tem limitado o desenvolvimento de métodos analíticos. Na ausência de padrões analíticos para as micotoxinas conjugadas, bem como quando as micotoxinas mascaradas estão ligadas a macromoléculas, a quantificação das micotoxinas mascaradas tem sido realizada indiretamente (BERTHILLER et al., 2013, 2016; BRYLA et al., 2014; CIRLINI; DALL'ASTA; GALAVERNA, 2012).

Os chamados métodos indiretos de análise possuem a vantagem de não requisitar o uso de padrões analíticos das micotoxinas conjugadas, o que tem contornado a indisponibilidade destas substâncias. Além disso, os métodos indiretos de análise podem clivar conjugados desconhecidos fornecendo uma avaliação mais realista dos níveis de contaminação. Os mesmos se baseiam na conversão das micotoxinas mascaradas por tratamento químico (ácido ou básico) ou enzimático para a forma livre ou alterada das mesmas, seguida da quantificação da forma livre antes e depois da conversão, onde as micotoxinas mascaradas são quantificadas através da diferença entre as duas formas de quantificação. No entanto, quando padrões analíticos não estão disponíveis a eficiência da etapa de clivagem não é conhecida.

Os métodos enzimáticos têm sido amplamente empregados na clivagem de conjugados de diversos contaminantes, incluindo micotoxinas (BELOGLAZOVA et

al., 2013; MALACHOVÁ et al., 2015b; WARTH et al., 2012). No entanto, a conversão de metabólitos conjugados através de reações enzimáticas é considerada uma clivagem específica de apenas uma forma conjugada sendo necessária a utilização de diversas enzimas, como foi demonstrado em um estudo realizado por Gareis et al. (1990). Nesse estudo a enzima β -glucosidase demonstrou eficiência para converter a ZEA-14G para a sua forma livre (ZEA), porém foi ineficiente para clivar o conjugado D3G. Em estudo realizado por Simsek et al. (2012) na análise de DON e D3G em trigo, foram realizados experimentos para determinar o efeito da hidrólise enzimática na detecção de DON utilizando as enzimas α -amilase, celulase, protease e xinalase. Foi observado o aumento significativo de DON apenas em amostras de trigo tratadas com a enzima xinalase.

Os métodos indiretos também podem ser utilizados para resolver problemas cromatográficos. Como exemplo, as micotoxinas DON e acetilados de DON também têm sido analisadas por CG-EM. Entretanto, o D3G possui maior polaridade ocasionando problemas cromatográficos em colunas tradicionalmente utilizadas na análise de DON. Para contornar este problema, os conjugados de DON podem ser hidrolisados retornando à forma livre da micotoxina. A adição dos ácidos trifluoracético, trifluorometanosulfônico e ácido tricloroacético seguida de aquecimento, demonstrou um aumento nas concentrações de DON em comparação com as mesmas amostras analisadas pelo método de extração tradicional para determinação de DON em sua forma livre. Este aumento tem sido atribuído a possível presença de DON mascarado sob a forma de conjugados, como por exemplo D3G ou associado a macromoléculas (LIU et al., 2005; TRAN; SMITH, 2011; TRAN; SMITH; GIRGIS, 2011; ZHOU et al., 2007). Sendo assim, a quantificação indireta de conjugados de DON, bem como outras formas conjugadas desconhecidas, utilizando a técnica de CG-EM após hidrólise ácida pode ser empregada.

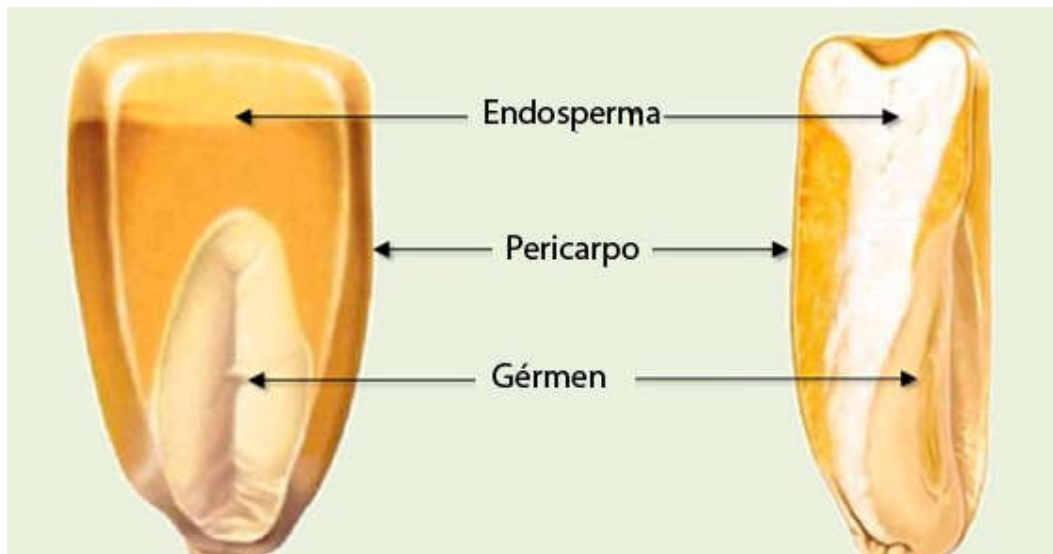
A quantificação das fumonisinas mascaradas (ligadas a macromoléculas) também tem sido realizada indiretamente através da quantificação das formas hidrolisadas, obtidas por meio de hidrólise alcalina das fumonisinas mascaradas. Além disso, os padrões analíticos das fumonisinas hidrolisadas podem ser facilmente obtidos a partir da hidrólise das fumonisinas adquiridas comercialmente, possibilitando assim, a calibração e conseqüente quantificação das formas hidrolisadas.

Diferentes métodos analíticos para a determinação indireta de fumonisinas mascaradas foram desenvolvidos nos últimos anos. Em um método reportado por Dall'Asta et al. (2008), a determinação simultânea das principais fumonisinas B1, B2, B3 e seus derivados hidrolisados HFB1, HFB2 e HFB3 em milho e produtos à base de milho, foi demonstrada. Neste estudo, inicialmente as formas livres das fumonisinas são extraídas das amostras diretamente com solução de água:acetonitrila (50:25:25, v/v). Posteriormente, o resíduo sólido das amostras é submetido à hidrólise com solução de NaOH (2M) a 25°C por 60 minutos, filtrado e analisado utilizando a técnica de CLAE-EM/EM; Em outro método reportado por Kim et al. (2003) e Park et al. (2004) para determinação de fumonisinas mascaradas em produtos à base de milho, as proteínas dos alimentos são dissolvidas com solução de dodecil sulfato de sódio (1%) e em seguida as fumonisinas mascaradas são hidrolisadas com solução de NaOH (2M); Em método descrito por Dall'Asta et al. (2009b), inicialmente as amostras são submetidas à hidrólise com solução de KOH (2M) e posteriormente extraídas com acetonitrila. Após centrifugação o extrato é então evaporado, redissolvido em água:metanol (30:70, v/v), filtrado e analisado por CLAE-EM/EM.

2.6 Características e processamentos do milho

O milho é um dos cereais mais importantes produzidos no mundo. Sua importância econômica é caracterizada pelas diversas formas de utilização, a começar pela alimentação animal até a indústria de alta tecnologia, como embalagens e filmes biodegradáveis. O grão de milho é formado principalmente por três partes: endosperma, representando aproximadamente 83% do grão, constituído em maior parte por amido e em menor quantidade por proteínas; gérmen representando 11% do grão, concentrando quase a totalidade dos lipídeos; e pericarpo (casca), representando em média 5% do grão (PAES, 2006; REGITANO-D'ARCE; SPOTO; CASTELLUCCI, 2015).

Figura 4- Composição básica do grão de milho.



Fonte: (AMARAL; BERNARDES, 2012).

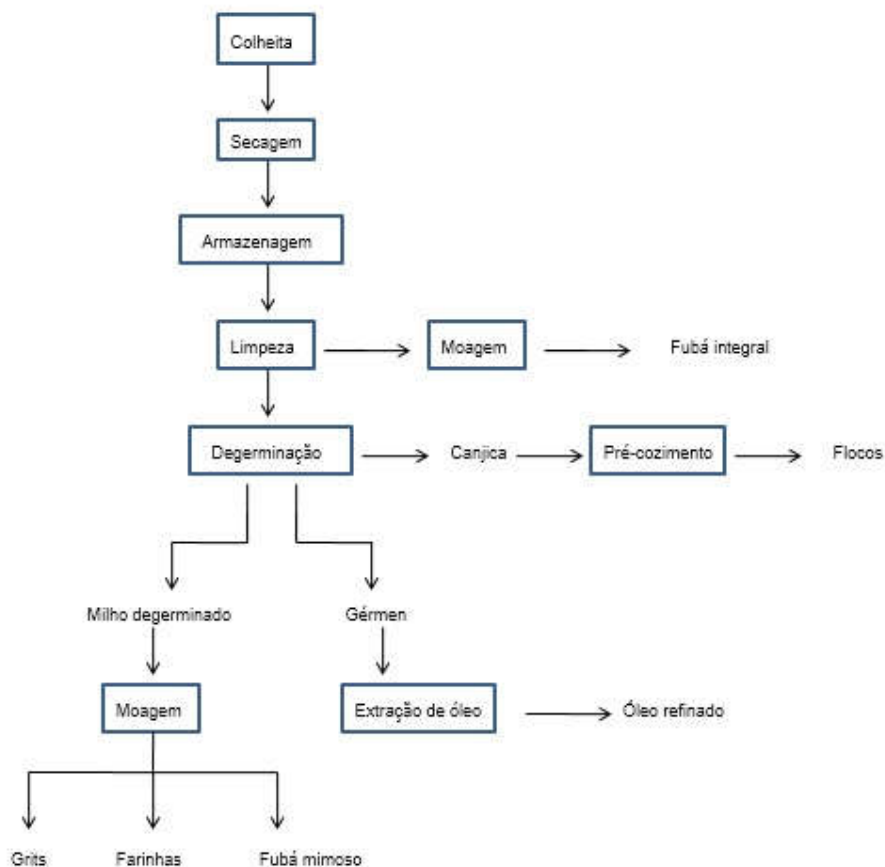
O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, com 96,03 milhões de toneladas produzidas na safra 2016/2017 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2017).

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias do Milho (Abimilho), a quantidade de milho destinada à alimentação humana representa apenas 15% do milho produzido no país (REGITANO-D'ARCE; SPOTO; CASTELLUCCI, 2015), ainda assim, o milho é o cereal com o maior número de produtos industrializados. (ALESSI; RAUPP; GARDINGO, 2003; GARCIA; DUARTE, 2017).

Entre os principais tipos de milho utilizados na alimentação humana, estão o milho branco, milho pipoca, milho verde e os grãos secos. O milho branco é comumente utilizado na produção de canjica. O milho pipoca, vem de um tipo especial de espiga com grãos pequenos constituídos principalmente de amido duro que se expande sob o aquecimento, dando origem a pipoca. O milho verde (*in natura*) pode ser consumido por maneira direta (cozido, assado ou em conservas) e os grãos secos dão origem aos produtos processados obtidos da moagem úmida e/ou seca. A moagem seca é a mais utilizada no Brasil, resultando em produtos como fubá, farinha de milho, quirera (canjiquinha), farelos, óleo e farinha integral (CARDOSO et al., 2011; GARCIA; DUARTE, 2017; REGITANO-D'ARCE; SPOTO;

CASTELLUCCI, 2015; SARMENTO, 2013). Na figura 5, é demonstrado o processo de moagem seca dos grãos de milho e alguns produtos resultantes.

Figura 5- Processo de moagem seca dos grãos de milho.



Fonte: (Adaptado de CARDOSO et al., 2011).

Na moagem seca o grão é degerminado, separado em endosperma, pericarpo e gérmen (Figura 5). O milho degerminado é caracterizado pelo endosperma desprovido da película (casca) e do gérmen, sendo denominado como canjica. A partir do milho degerminado, são obtidos grits (grão degerminado quebrado em duas ou três partes) e fubás de diferentes granulometrias. (AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, 2017; CARDOSO et al., 2011).

A partir da canjica (grits) de milho, são obtidos os flocos de milho e produtos como os cereais matinais (corn flakes), salgadinhos de milho (snacks), entre outros. Em relação ao fubá e farinha de milho, têm-se algumas peculiaridades devido a variações granulométricas e formas de produção. O fubá pode ser resultante da moagem do grão integral de milho (fubá comum) ou da canjica (fubá mimoso). Já a

farinha de milho tradicional, é definida pela legislação brasileira como um produto obtido por moagem úmida (maceração dos grãos) e posterior processo de torração dos grãos degerminados ou não (ALESSI; RAUPP; GARDINGO, 2003; BRASIL, 1978; CARDOSO et al., 2011; SARMENTO, 2013).

Os flocos de milho e salgadinhos de milho (snacks), também podem ser obtidos por extrusão, processo de alta temperatura em curto tempo, onde o alimento é cozido pela combinação de umidade, temperatura, pressão e trabalho mecânico (AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, 2017; CARVALHO, 2000, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de fumonisinas B1 e B2 livres e mascaradas em milho e seus produtos derivados consumidos no Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Validar um método analítico para determinação das fumonisinas B1 e B2 livres em milho e produtos à base de milho por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial;
- Validar um método analítico para determinação de fumonisinas B1 e B2 totais em milho e produtos à base de milho por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial;
- Avaliar a ocorrência das fumonisinas B1 e B2 livres em amostras de milho e produtos à base de milho adquiridos no Brasil;
- Avaliar a concentração de fumonisinas B1 e B2 mascaradas em amostras de milho e produtos à base de milho;
- Avaliar a correlação entre a razão da concentração de fumonisinas livres e mascaradas em relação aos processamentos utilizados no preparo dos diferentes produtos à base de milho analisados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e solventes

Para o preparo das amostras, curvas de calibração e fase móvel foram utilizados os reagentes: acetonitrila e metanol (HPLC-grade), hidróxido de potássio, ácido fórmico e acetato de etila obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Água ultra-pura foi obtida através de sistema Milli-Q Gradient (Millipore, Bedford, MA, USA).

4.2 Padrões analíticos

As soluções padrão das fumonisinas B1 e B2 ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) em acetonitrila/água 1:1 (v/v) utilizadas neste estudo foram obtidas da Fluka/Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). As fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas foram preparadas no laboratório através da hidrólise das fumonisinas B1 e B2 obtidas comercialmente de acordo com o procedimento de Dall'Asta et al. (2009b).

Uma alíquota (1 mL) de uma solução padrão contendo as fumonisinas B1 e B2 ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) em acetonitrila/água 1:1 (v/v) foi evaporada à secura sob fluxo de N_2 a $40 \text{ }^\circ\text{C}$; o resíduo foi redissolvido em 1 mL de solução 2 mol L^{-1} de KOH e deixado reagir por 12 h à temperatura ambiente. As fumonisinas hidrolisadas foram então extraídas da solução alcalina com 5 mL de acetato de etila sob agitação (este procedimento foi repetido três vezes). Os extratos provenientes das extrações foram combinados e secos sob fluxo de N_2 e o resíduo redissolvido em 1 mL de metanol. Foi verificada a ausência ($<\text{LD}$) das fumonisinas B1 e B2 nesta solução por CLUE-EM/EM, e a conversão total para as fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas foi assumida. As concentrações das formas hidrolisadas foram calculadas considerando-se os fatores de conversão estequiométrica, obtendo-se $28,1$ e $27,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as concentrações das fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas, respectivamente. Todas as soluções estoque foram armazenadas a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3 Equipamentos

Neste estudo os seguintes equipamentos foram utilizados: balança analítica

(SARTORIUS LP620P), vórtex (IKA Work), homogeneizador (Ultra-Turrax, IKA®), agitador (Burrel, Wrist Action Shaker, Modelo 75), centrífuga com refrigeração (HITACHI, CF 7D2), bomba de vácuo (MILLIPORE), ultrassom (BRANSON, 2510) e fluxo de nitrogênio (Turbo-Vac LV).

4.3.1 Instrumental (CLUE- EM/EM)

A separação cromatográfica foi realizada utilizando um sistema (Waters UPLC® I-Class ACQUITY) equipado com uma coluna cromatográfica BEH C18 (100 mm x 2,1 mm i.d., 1,7 µm) mantida à temperatura de 35 °C. O fluxo da fase móvel foi mantido constante em 0,3 mL/min. Diferentes proporções do solvente orgânico no gradiente inicial (20, 40, 60, 62 e 65%), com um gradiente linear terminando em 70 e 80% de solvente orgânico, bem como a adição de ácido fórmico (0,1 e 0,3%) à fase móvel aquosa foram estudados com o intuito de obter maior sensibilidade e formato adequado dos picos cromatográficos. A coluna foi então lavada com metanol (100%) por 1 min e em seguida o sistema foi reequilibrado por 2 min na condição inicial da fase móvel. O volume de injeção foi de 5 µL.

A detecção foi realizada empregando-se um espectrômetro de massas sequencial do tipo quadrupolo (Waters, Xevo® TQ-S) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) operado em modo de ionização positivo.

4.4 Amostras

No total, foram coletadas 212 amostras de milho pipoca e produtos à base de milho produzidas por 40 fabricantes, representando 46 marcas.

Inicialmente, entre junho e outubro de 2016, 86 amostras (0,5 a 1 kg) de milho pipoca (n= 20), farinha de milho flocada ou flocos de milho (n= 20), farinha de milho torrada (n= 6), fubá (n= 20), canjica branca (n= 10) e canjiquinha (n= 10) foram adquiridas em supermercados da região metropolitana do Rio de Janeiro. Estas amostras foram utilizadas na validação dos métodos e analisadas quanto à contaminação por fumonisinas livres.

Entre agosto de 2016 e fevereiro de 2017, os Laboratórios Centrais Estaduais (LACENs) dos Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Pará, Santa Catarina, Goiás, Mato Grosso do Sul e Pernambuco

enviaram ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde (INCQS) um total de 126 amostras (1 kg) de milho de pipoca (n= 30), farinha de milho flocada ou flocos de milho (n= 29), farinha de milho torrada (n= 12), fubá (n= 30), canjica branca (n= 5), canjiquinha (n= 11) e canjiquinha/curau de milho (n= 9) comercializados nos mercados locais, coletados no âmbito do Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes em Alimentos (PROMAC)/2016 pactuado entre a Anvisa e as Vigilâncias Sanitárias Estaduais.

4.5 Preparo das amostras

Todas as amostras analisadas foram moídas em moinho de martelo (MA-090/CF), peneiradas em peneira de 20 mesh (0,84 mm), homogeneizadas por 1h (CONSERLI-MP20, 15 rpm) e armazenadas em freezer (-20°C) até serem analisadas seguindo os procedimentos descritos a seguir.

4.5.1 Homogeneidade das amostras

Para realização do estudo de homogeneidade uma amostra de milho pipoca (1 kg), naturalmente contaminada com as fumonisinas B1 e B2, foi moída em moinho de martelo (MA-090/CF), peneirada em peneira de 20 mesh (0,84 mm) e homogeneizada por 1 h (CONSERLI-MP20, 15 rpm). Foram analisadas 6 alíquotas independentes para cada massa de amostra avaliada (1, 5 e 10 g).

As amostras foram extraídas em tubo Falcon de 50 mL de capacidade em ultrassom (BRANSON/3510) por 10 min, utilizando solução de metanol 75% e mantendo uma proporção de cinco vezes a massa de amostra (Ex: 5mL do solvente de extração para 1 g de amostra). Após centrifugação, uma alíquota de 50 µL do extrato foi diluído com 950 µL da solução metanol:água:ácido fórmico (75/24,9/0,1, v/v/v) e filtrado em filtro 0,22 µm (Millex-GV 13 mm).

Para avaliar a influência da etapa de homogeneização por 1 h na homogeneidade da amostra, 6 alíquotas de 5 g foram pesadas em etapa anterior a homogeneização de quatro amostras de milho pipoca. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos para as fumonisinas em alíquotas retiradas após a homogeneização por 1h.

4.5.2 Otimização do método de preparo das amostras

4.5.2.1 Fumonisinas livres

Na otimização do método para determinação de fumonisinas livres, diversos procedimentos de tratamento de amostra foram selecionados e modificados com o objetivo de reduzir o tempo de análise, bem como adequar às condições analíticas do laboratório. Assim, todas as extrações avaliadas foram realizadas utilizando agitação em vórtex (2 min) seguida de 10 min em ultrassom (SARTORI, 2015). Os extratos foram diluídos para minimizar a extensão do possível efeito de matriz (supressão/ ganho de sinal analítico). Para realização dos estudos, amostras de milho pipoca (moídas e homogeneizadas) foram fortificadas com as fumonisinas B1 e B2 ($1200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e com as fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$) e dispostas em capela de exaustão por 24 h para evaporação do solvente utilizado na fortificação. Os procedimentos avaliados neste estudo estão descritos a seguir.

Procedimento A: (LI et al., 2012): 5 g de amostra foram pesados em tubo de centrífuga com 50 mL de capacidade, 25 mL da solução de extração 75% de metanol foram adicionados. O tubo foi agitado por 2 min e em seguida sonificado por 10 min. O tubo foi então centrifugado a 3000 rpm por 7 min. Uma alíquota do extrato (0,05 mL) foi diluída com 0,95 mL de uma solução metanol/água/ácido fórmico (75:24,9:0,1 v/v/v) e a solução resultante foi filtrada (0,22 μm) antes das análises.

Procedimento B: (SCOTT et al., 1999): 5 g de amostra foram pesados em tubo de centrífuga com 50 mL de capacidade, 25 mL da solução de extração metanol:acetonitrila:água (25:25:50 v/v/v) foram adicionados. O tubo foi agitado por 2 min e em seguida sonificado por 10 min. O tubo foi então centrifugado a 3000 rpm por 7 min. Uma alíquota do extrato (0,05 mL) foi diluída com 0,95 mL de uma solução metanol/água/ácido fórmico (75:24,9:0,1 v/v/v) e a solução resultante foi filtrada (0,22 μm) antes das análises.

Procedimento C: (BARTÓK et al., 2014; LAZZARO et al., 2013): 5 g de amostra foram pesados em tubo de centrífuga com 50mL de capacidade, 25 mL da solução de extração metanol a 80% foram adicionados. O tubo foi agitado por 2 min e em seguida sonificado por 10 min. O tubo foi então centrifugado a 3000 rpm por 7 min. Uma alíquota do extrato (0,05 mL) foi diluída com 0,95 mL de uma solução metanol/água/ácido fórmico (75:24,9:0,1 v/v/v) e a solução resultante foi filtrada (0,22

µm) antes das análises.

Procedimento D: (MOL et al., 2008): 5 g de amostra foram pesados em tubo de centrífuga com 50 mL de capacidade, 25 mL da solução de extração acetoneitrila/água/ácido fórmico (75:24:1 v/v/v) foram adicionados. O tubo foi agitado por 2 min e em seguida sonificado por 10 min. O tubo foi então centrifugado a 3000 rpm por 7 min. Uma alíquota do extrato (0,05 mL) foi diluída com 0,95 mL de uma solução metanol/água/ácido fórmico (75:24,9:0,1 v/v/v) e a solução resultante foi filtrada (0,22 µm) antes das análises.

Procedimento E: (SARTORI, 2015): 5 g de amostra foram pesados em tubo de centrífuga com 50 mL de capacidade, 25 mL da solução de extração água:acetoneitrila (1:2 v/v) com 1% de ácido fórmico foram adicionados. O tubo foi agitado por 2 min e em seguida sonificado por 10 min. O tubo foi então centrifugado a 3000rpm por 7min. Uma alíquota do extrato (0,05 mL) foi diluída com 0,95 mL de uma solução metanol/água/ácido fórmico (75:24,9:0,1 v/v/v) e a solução resultante foi filtrada (0,22 µm) antes das análises.

Procedimento F: (KOSTELANSKÁ et al., 2010; SULYOK et al., 2007; YIBADATIHAN et al., 2014): 5 g de amostra foram pesados em tubo de centrífuga com 50 mL de capacidade, 25 mL da solução de extração acetoneitrila/água/ácido fórmico (80:19:1 v/v/v) foram adicionados. O tubo foi agitado por 2 min e em seguida sonificado por 10 min. O tubo foi então centrifugado a 3000 rpm por 7 min. Uma alíquota do extrato (0,05 mL) foi diluída com 0,95 mL de uma solução metanol/água/ácido fórmico (75:24,9:0,1 v/v/v) e a solução resultante foi filtrada (0,22 µm) antes das análises.

4.5.2.2 Fumonisinias totais (após hidrólise alcalina)

Para avaliar o tempo necessário para a hidrólise das micotoxinas presentes nas amostras foram utilizadas alíquotas (5 g) de uma amostra de milho pipoca naturalmente contaminado com as fumonisinias B1 e B2, as quais foram pesadas em tubos plásticos com 250 mL de capacidade. Em cada alíquota da amostra foi adicionado 50 mL de uma solução 2 mol L⁻¹ de KOH. As amostras foram então homogeneizadas por 1 min (Ultra-Turrax, IKA®) e a eficiência de hidrólise foi avaliada empregando-se diferentes tempos de agitação (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos) usando um agitador (Burrel, Wrist Action Shaker, Modelo 75). Após o

tempo de hidrólise, as amostras foram extraídas com 50 mL de acetonitrila sob agitação por 30 min (Burrel, WristActionShaker, Modelo 75) e, em seguida, centrifugada a 3000 rpm durante 7 min (Hitach-HIMAC CF 7D2). Uma alíquota do extrato (0,05 mL) foi diluída com 0,95 mL de uma solução metanol/água/ácido fórmico (50:49,9:0,1, v/v/v) e a solução resultante foi filtrada utilizando filtro de PVDF (0,22 μm) antes das análises.

4.5.3 Seleção do solvente de diluição do extrato da amostra

Para a diluição dos extratos das amostras, diferentes proporções dos solventes (metanol/ água) foram testados com o objetivo de avaliar o efeito na sensibilidade do método. Assim, uma amostra foi fortificada com as substâncias alvo em concentrações de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas e de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para fumonisinas B1 e B2, aplicando-se o método de tratamento de amostras selecionado para ser validado. Após o tratamento da amostra, alíquotas do extrato (0,05 mL) foram diluídas com 0,95 mL a partir de cada solução de diluição demonstrada nas condições a seguir; o ácido fórmico foi adicionado para se obter uma concentração final de 0,1% em todas as condições estudadas. Os solventes avaliados na diluição dos extratos estão escritos a seguir:

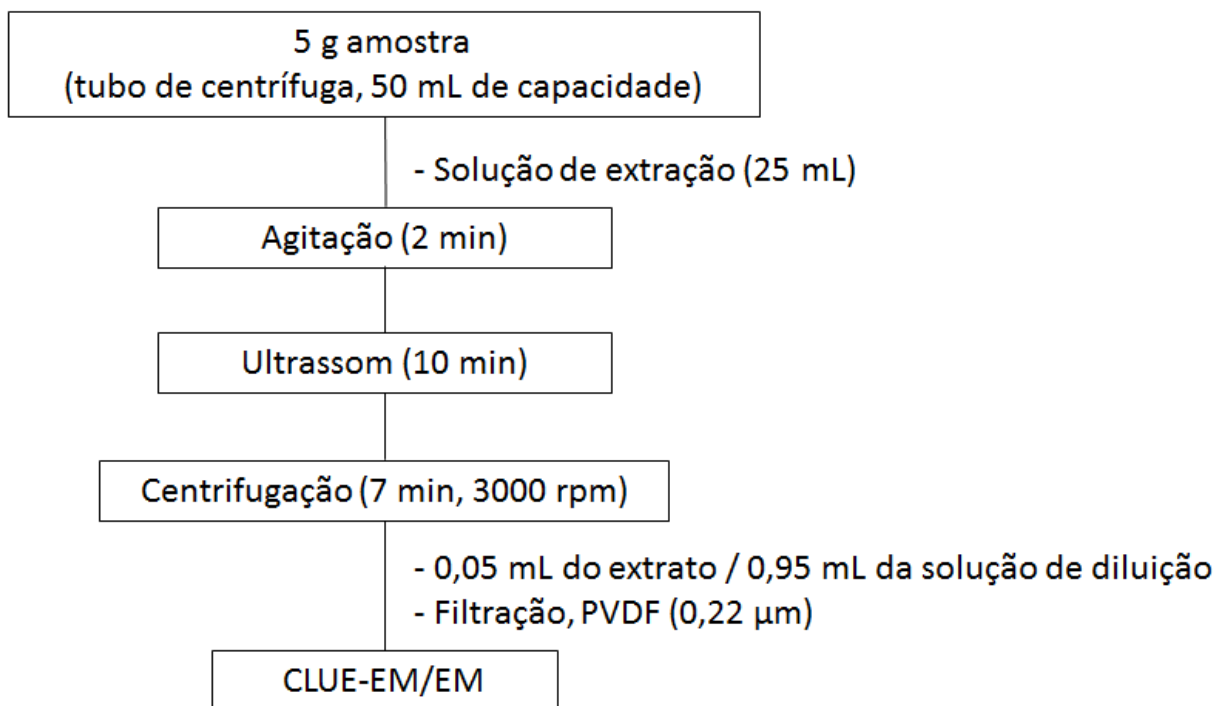
1. Metanol/água/ácido fórmico (25:74,95:0,05, v/v/v)
2. Metanol/água/ácido fórmico (50:49,95:0,05, v/v/v)
3. Metanol/água/ácido fórmico (75:24,95:0,05, v/v/v)
4. Solução de ácido fórmico 0,05%

4.5.4 Fumonisinas livres

Para a análise de fumonisinas livres, as amostras foram previamente descongeladas à temperatura ambiente e posteriormente pesadas (5 g) em tubo de centrifuga com 50 mL de capacidade. Em seguida, adicionou-se 25 mL da solução de extração acetonitrila/água/ácido fórmico (75:24:1 v/v/v). O tubo foi então agitado vigorosamente por 2 min utilizando-se um vórtex (IKA Work), e em seguida foi sonificado por 10 min (BRANSON/ 2510). Então, o tubo foi transferido para uma

centrifuga (Hitach- HIMAC CF 7D2) e submetido à centrifugação por 7 min a 3000 rpm. Uma alíquota do extrato (0,05 mL) foi diluída com 0,95 mL de uma solução metanol/água/ácido fórmico (50:49,95:0,05, v/v/v) e a solução resultante foi filtrada utilizando filtro de PVDF (0,22 μm) antes das análises (MOL et al., 2008). O fluxograma do preparo das amostras é apresentado na figura 6.

Figura 6- Fluxograma do preparo das amostras para análise de fumonisinas livres.



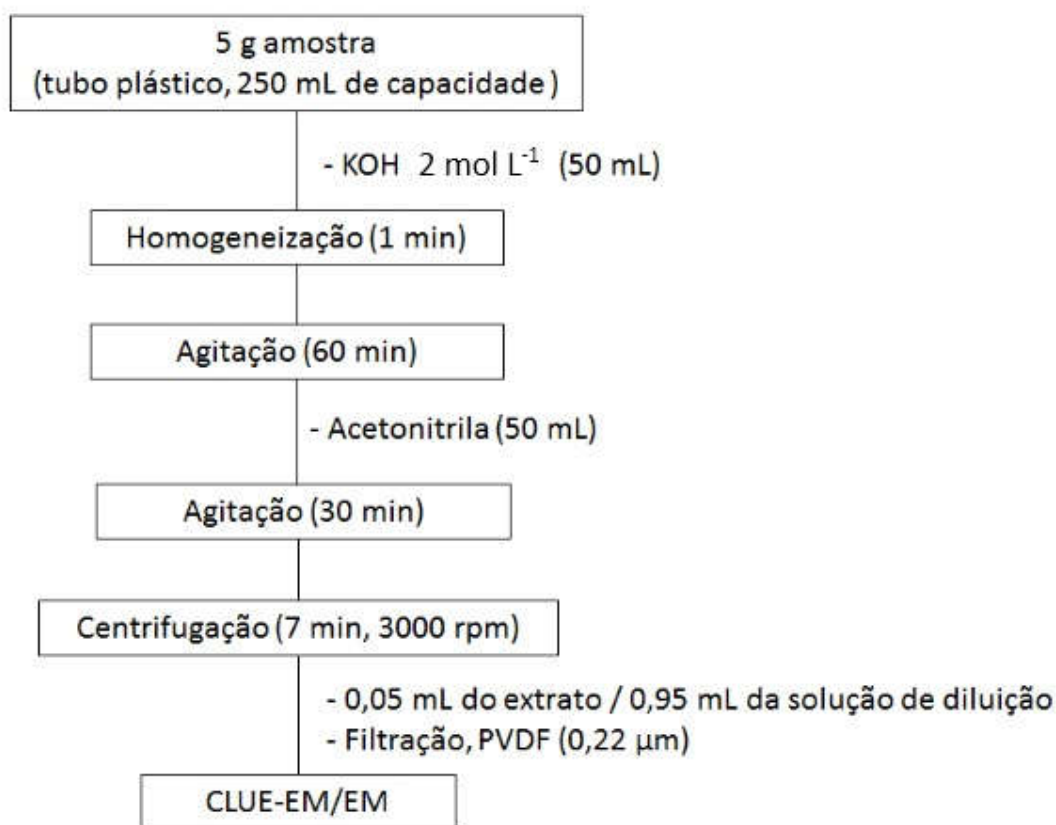
Fonte: (Do autor, 2017).

4.5.5 Fumonisinas totais (após hidrólise alcalina)

Para a análise de fumonisinas totais, a preparação das amostras foi realizada com base no método reportado por Dall'Asta et al. (2009b): As amostras foram previamente descongeladas à temperatura ambiente e em seguida pesados (5 g) em tubo plástico com 250 mL de capacidade. Então, foram adicionados 50 mL de uma solução 2 mol L⁻¹ de KOH. A amostra foi então homogeneizada por 1 min (Ultra-Turrax, IKA®) e em seguida agitada por 60 min (Burrel, Wrist Action Shaker, Modelo 75). Após, 50 mL de acetonitrila foi adicionado e a amostra foi agitada durante 30 min (Burrel, Wrist Action Shaker, Modelo 75) e em seguida centrifugada a 3000 rpm

durante 7 min (Hitach-HIMAC CF 7D2). Uma alíquota do extrato (0,05 mL) foi diluída com 0,95 mL de uma solução metanol/água/ácido fórmico (50:49,9:0,1, v/v/v) e a solução resultante foi filtrada utilizando filtro de PVDF (0,22 μm) antes das análises. O fluxograma do preparo das amostras é apresentado na figura 7.

Figura 7- Fluxograma do preparo das amostras para análise de fumonisinas totais (após hidrólise alcalina).



Fonte: (Do autor, 2017).

4.6 Validação

O desenvolvimento, adaptação ou implementação de um método analítico envolve uma avaliação para estimar a sua efetividade na rotina de um laboratório, processo que é denominado como validação (BRITO et al., 2003).

Os parâmetros de desempenho dos métodos analíticos foram avaliados de acordo as normas de legislações vigentes e o Protocolo de Validação de Métodos de

Análise para Micotoxinas em Alimentos- POP 65.3120.145 do Laboratório de Análise de Resíduos de Micotoxinas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009). Os parâmetros avaliados foram: seletividade, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

4.6.1 Seletividade

A seletividade é definida pela capacidade de um método em detectar o analito de interesse na presença de interferentes presentes na matriz (BRESSOLLE; BROMET-PETIT; AUDRAN, 1996; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2017).

Para avaliar a seletividade, os tempos de retenção observados nas amostras foram comparados com os tempos de retenção obtidos utilizando soluções padrão. A confirmação foi realizada por comparação das razões das intensidades das transições dos íons obtidas para as micotoxinas nas amostras com as razões obtidas na solução padrão (CE, 2002).

4.6.2 Efeito matriz

O efeito matriz é causado pela influência das propriedades da matriz na amostra. Ocorre quando são obtidos resultados diferentes ao quantificar o analito com a curva de calibração construída em matriz e construída em solvente, podendo impactar na exatidão e precisão do método analítico (WANG; LI, 2015).

Para investigar o efeito matriz dos métodos utilizados na determinação de fumonisinas livres e totais foram preparadas curvas de calibração nas matrizes estudadas (*matrix-matched calibration*) e em solvente, utilizando os cinco menores níveis de concentração das curvas de calibração utilizadas nos estudos de linearidade. A análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para comparação das inclinações das curvas de calibração preparadas em matriz com as curvas de calibração preparadas em solvente, considerando um nível de significância de 5% (GARCÍA-CAMPAÑA et al., 1997).

Para avaliar a extensão do efeito matriz, os coeficientes angulares das curvas de calibração preparadas em solvente e em matriz foram comparados e o cálculo foi

realizado pela equação 1 (SARTORI, 2015).

Equação 1

$$\text{Efeito Matriz} = (\text{coeficiente angular}_{\text{matriz}} - \text{coeficiente angular}_{\text{solvente}} / \text{coeficiente angular}_{\text{solvente}}) \times 100$$

4.6.3 Linearidade

A linearidade é a capacidade do método em gerar resultados proporcionais à concentração de analito presente na amostra, em uma faixa analítica específica (BRITO et al., 2003).

Para a quantificação das amostras analisadas foram preparadas curvas de calibração com as substâncias de interesse em cada matriz estudada. As faixas de concentrações estudadas foram de 0,05 a 25 ng mL⁻¹ para fumonisinas B1 e B2; 0,005 a 2,5 ng mL⁻¹ para fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas; e 0,1 a 10 ng mL⁻¹ para as fumonisinas totais (após hidrólise).

A linearidade de todas as curvas de calibração preparadas em matriz e utilizadas na rotina foi avaliada a partir de uma planilha de cálculo em Excell de Bazílio et al. (2011) adaptada de Souza & Junqueira (2005). Como premissas para a análise de regressão foram verificadas a homocedasticidade, a independência e a normalidade dos resíduos da regressão. Os valores aberrantes foram investigados pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife (BELSLEY; KUH; WELSCH, 1980).

4.6.4 Exatidão e Precisão

A exatidão de um método analítico indica o grau de concordância entre o valor real do analito na amostra e o valor estimado pelo método. A precisão indica a dispersão dos resultados de ensaios independentes da mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, conforme as condições definidas (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2017; RIBANI et al., 2004).

A repetibilidade indica o grau de concordância entre os resultados de análises individuais, a partir de um mesmo método sob as mesmas condições de medição e em pequeno intervalo entre as repetições. A precisão intermediária ou

reprodutibilidade parcial representa as variações dentro de um laboratório, como exemplo: diferentes dias, analistas ou equipamentos; definindo quais condições a variar (BRITO et al., 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2017; RIBANI et al., 2004).

A exatidão (recuperação) e a precisão (repetibilidade e precisão intermediária) dos métodos analíticos foram avaliadas por meio da aplicação dos métodos na análise de amostras “branco” ou com baixo nível de contaminação (concentração dez vezes menor que o menor nível de concentração utilizado na fortificação) fortificadas com as micotoxinas alvo. O milho pipoca foi selecionado como matriz representativa para avaliação da exatidão e precisão na faixa de aplicação dos métodos analíticos. Assim, amostras de milho pipoca foram fortificadas em quatro níveis de concentração (200, 2000, 4000 e 6000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para o método utilizado na determinação direta de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas, e em três níveis de concentração (200, 2000 e 4000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para o método utilizado na determinação indireta de fumonisinas totais (após hidrólise), com seis replicatas para cada nível de concentração estudado. A precisão intermediária para os dois métodos avaliados foi realizada através da análise de amostras fortificadas com as mesmas concentrações utilizadas no primeiro nível de fortificação de cada método (nível de concentração considerado mais crítico). Estas amostras foram analisadas em 6 dias diferentes.

Para os produtos à base de milho, seis amostras “branco” ou com baixo nível de contaminação de cada produto (flocos de milho, farinha de milho, fubá, canjiquinha e canjica branca) foram fortificadas com substâncias alvo (2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e utilizadas para avaliar a recuperação e a repetitividade do método de determinação direta de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas.

Os cálculos de recuperação (Rec%) e desvio padrão relativo (DPR%) dos métodos analíticos foram realizados a partir das equações 2 e 3.

Equação 2

$$\text{Rec\%} = \frac{\text{C medida}}{\text{C fortificada}} \times 100$$

Sendo:

Rec= Recuperação

C= Concentração

Equação 3

$$\text{DPR\%} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Sendo:

DPR= Desvio padrão relativo

DP= Desvio padrão

CMD= Concentração média determinada

4.6.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O Limite de Detecção (LD) corresponde à menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada pelo método, mas não necessariamente quantificada. O Limite de Quantificação corresponde à menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível de exatidão e precisão (RIBANI et al., 2004).

Os LD e LQ das micotoxinas alvo foram determinados pelo método da relação sinal/ruído, considerando razões de sinal/ruído de 3 e 10, respectivamente (EDIAGE et al., 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Instrumental (CLUE- EM/EM)

5.1.1 Otimização das condições do detector

Os parâmetros da fonte de ionização otimizados foram: voltagem do capilar (3 kV), temperatura de dessolvatação (400 °C) e temperatura da fonte (150 °C). Nitrogênio foi usado como gás do cone e gás de dessolvatação em um fluxo de 150 L h⁻¹ e 750 L h⁻¹, respectivamente. Argônio foi usado como gás de colisão em um fluxo de 0,15 mL min⁻¹.

As condições do espectrômetro de massas foram otimizadas por infusão das soluções padrão individuais (100 ng mL⁻¹). O equipamento foi operado usando uma fonte *ESI* (electrospray ionization) em modo de ionização positivo. A voltagem do cone foi otimizada e íons protonados [M + H]⁺ foram selecionados para todas as substâncias alvo. Energias de colisão foram otimizadas para as principais transições identificadas. As duas transições de íons mais intensas, selecionadas através da relação sinal/ruído dos picos cromatográficos, foram usadas como as transições de quantificação e confirmação (Figura 8). As transições selecionadas e suas respectivas condições de aquisição estão apresentadas na Tabela 5. A energia do capilar foi avaliada na faixa de 0 a 4 kV; a voltagem de 3 kV apresentou a melhor resposta para todas as substâncias. A temperatura do gás de dessolvatação (N₂) foi avaliada na faixa de 200 a 500 °C; temperaturas superiores a 400°C não ofereceram ganho de sinal e, portanto, essa temperatura foi selecionada. O fluxo do gás de dessolvatação (N₂) foi avaliado na faixa de 300 a 1200 L h⁻¹; o fluxo de 750 L h⁻¹ foi selecionado já que fluxos superiores não ofereceram ganho de sinal para as substâncias. O fluxo do gás do cone (N₂) foi avaliado na faixa de 150 a 300 L h⁻¹; o fluxo foi mantido em 150 L h⁻¹ já que essa foi a melhor condição de sensibilidade para as substâncias.

Após distribuição das substâncias nas respectivas janelas de aquisição, o *dwell time* foi otimizado através da injeção de solução padrão das substâncias alvo (5 ng mL⁻¹) com o objetivo de obter picos cromatográficos com um número adequado de *scans* (entre 15 e 25). As condições otimizadas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5- Condições do espectrômetro de massas selecionadas.

Micotoxinas	t_R (min) ^a	Transição de quantificação Q (m/z)	Transição de qualificação q (m/z)	Q/q ^b	Energia de colisão (eV) ^c	Voltagem do cone (V)	Dwell time (100ms)
HFB1	1.18	406,3>370,2	406,3>352,2	1,3 (± 0,3)	20 / 20	64	0,1
FB1	1.23	722,3>334,2	722,3>352,2	1,0 (± 0,2)	40 / 36	86	0,1
HFB2	1.89	390,3>336,2	390,3>354,2	1,5 (± 0,3)	22 / 20	60	0,1
FB2	2.14	706,2>318,2	706,3>336,2	1,9 (± 0,4)	40 / 38	86	0,1

Fonte: (Do autor, 2017).

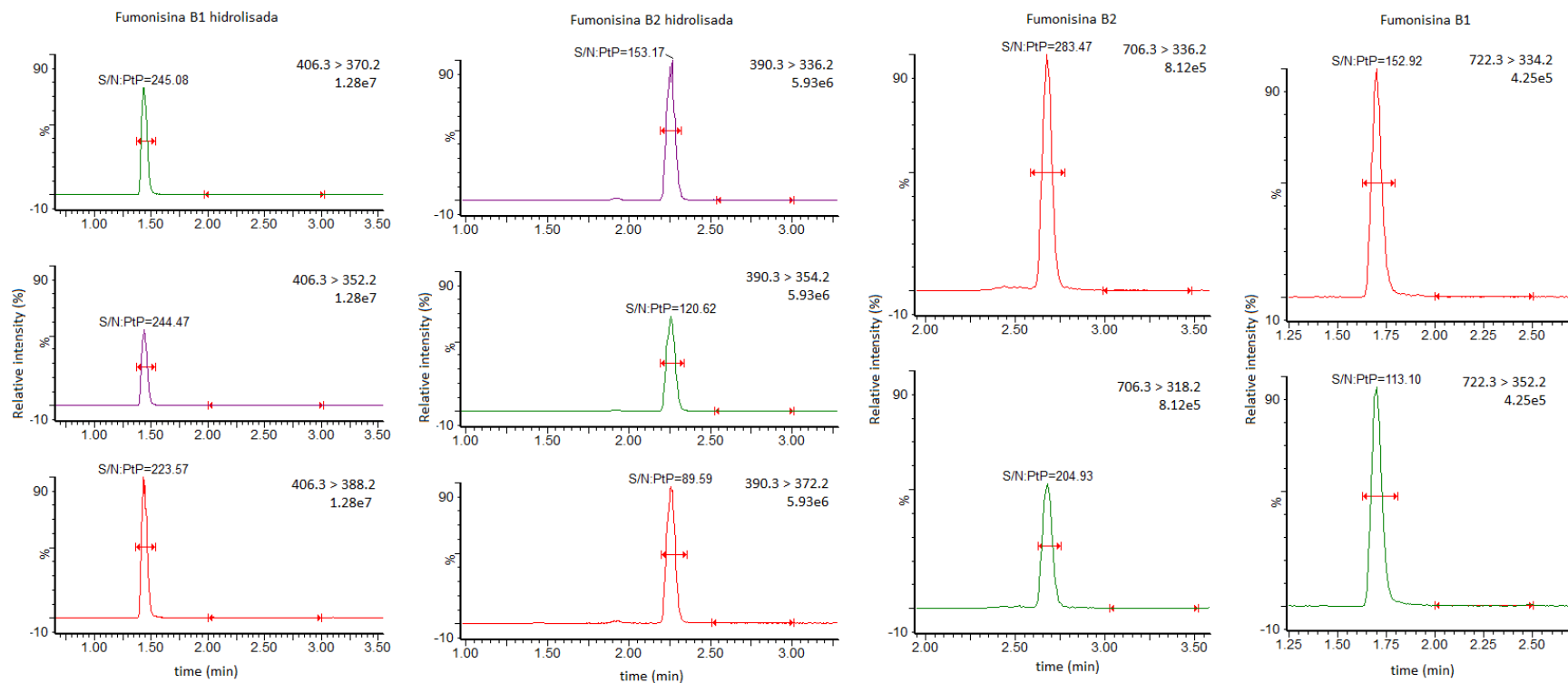
ESI operado em modo positivo para todas as substâncias;

^aJanelas de aquisição demonstradas entre parênteses;

^bIntensidades relativas para as transições dos íons (Q/q) e o máximo de tolerância aceitável para confirmação demonstrado entre parênteses (CE, 2002);

^cValores estão demonstrados na ordem: transição de quantificação / transição de qualificação.

Figura 8- Cromatogramas demonstrando as intensidades das transições dos íons das fumonisinas B1, B2 e B1 e B2 hidrolisadas.



Fonte: (Do autor, 2017).

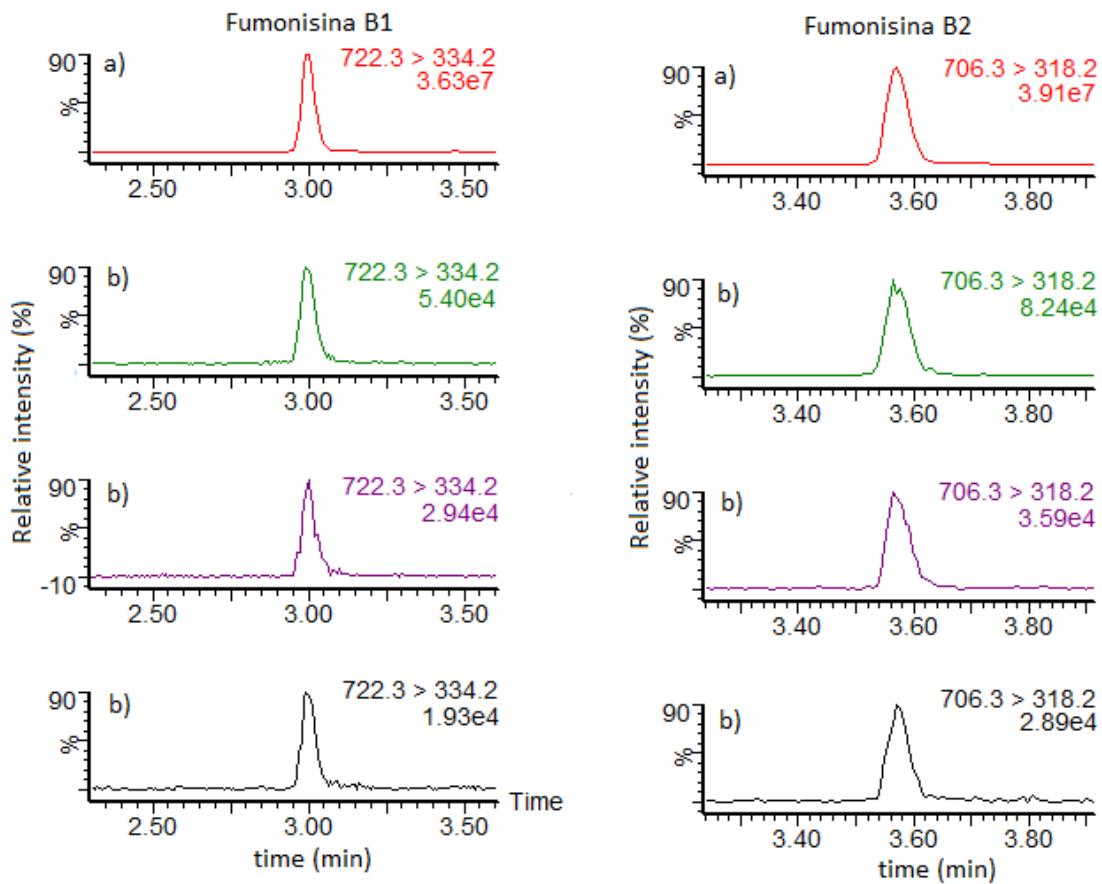
5.1.2 Otimização das condições cromatográficas

A composição da fase móvel foi estudada com o objetivo de obter picos cromatográficos com formato e sensibilidade adequados para todas as micotoxinas alvo. A presença de efeito memória (*carry over*) também foi considerada na avaliação. O metanol foi selecionado para ser utilizado como solvente orgânico.

Foi observado efeito memória para as fumonisinas, com essas substâncias aparecendo em vários ciclos de injeção após a injeção de uma solução padrão ou de uma amostra contaminada, utilizando os gradientes iniciando com 20 e 40, 60 e 62% de metanol. Este problema pode ocasionar falsos positivos nas análises de rotina e, portanto, deve ser resolvido. O problema de efeito memória para as fumonisinas também foi relatado anteriormente (PLATTNER et al., 1999; TAMURA et al., 2012). Como exemplos do problema observado, na Figura 9 são mostrados os cromatogramas obtidos com a injeção de solução padrão com as fumonisinas, seguido da injeção de solvente. Diversos solventes de lavagem da agulha do injetor foram avaliados, mas o efeito memória não foi eliminado.

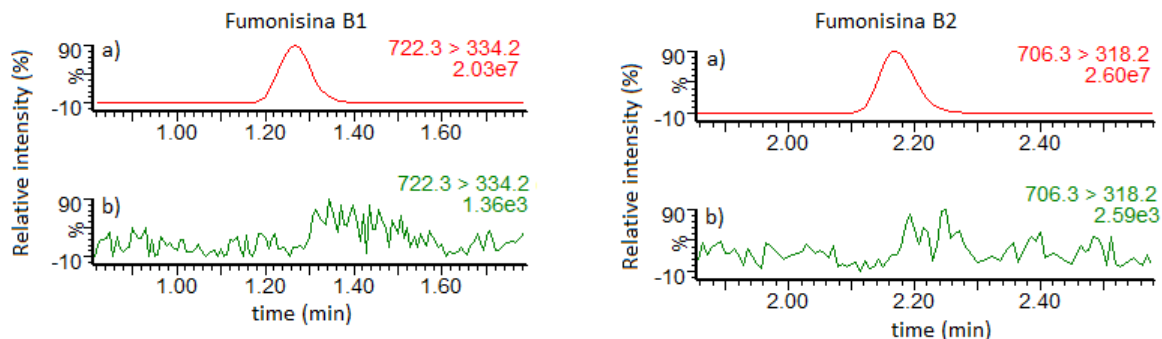
Foi observado diminuição do efeito memória com o aumento da proporção de metanol no gradiente inicial. Portanto, o gradiente de fase móvel iniciando com 65% de metanol foi selecionado, pois apresentou sensibilidade adequada para todas as substâncias alvo, sem ocorrência de efeito memória (Figura 10).

Figura 9- Cromatogramas demonstrando a ocorrência de efeito memória para as fumonisinas com o gradiente iniciando com 40% de metanol: a) solução padrão das fumonisinas (200 ng mL⁻¹); b) solvente (metanol/água, 50:50 v/v).



Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 10- Cromatogramas demonstrando a ausência de efeito memória para as fumonisinas com o gradiente iniciando com 65% de metanol: a) solução padrões das fumonisinas (200 ng mL^{-1}); b) solvente (metanol/água), 50:50 v/v).



Fonte: (Do autor, 2017).

Foram obtidos melhores resultados de sensibilidade para as micotoxinas alvo utilizando gradiente final com 80% de metanol, principalmente para fumonisina B2, em relação ao gradiente final com 70% de metanol.

Após a seleção da condição inicial (65% de metanol) e final do gradiente (80% de metanol) o tempo utilizado no gradiente (3, 4 e 5 min) também foi avaliado quanto à sensibilidade. O tempo de 3 min foi selecionado, pois apresentou maior sensibilidade para as micotoxinas avaliadas: para fumonisina B1 a resposta foi 17 e 25% inferior para os tempos de 4 e 5 min, respectivamente; para fumonisina B2 a resposta foi 19 e 17% inferior para os tempos de 4 e 5 min; para fumonisina B1 hidrolisada a resposta foi 10 e 15% inferior para os tempos de 4 e 5 min, respectivamente; para fumonisina B2 hidrolisada a resposta foi 17 e 26% inferior para os tempos de 4 e 5 min, respectivamente.

Resultados satisfatórios em relação ao efeito memória e formato dos picos cromatográficos foram obtidos utilizando solução de ácido fórmico 0,1 e 0,3%. Não foi observada diferença significativa para a fumonisina B2 e fumonisina B2 hidrolisada (~3%) comparando as duas fases móveis estudadas. No entanto, sensibilidades maiores foram obtidas para fumonisina B1 (24%) e fumonisina B1 hidrolisada (13%) utilizando ácido fórmico 0,1%, demonstrando possível supressão da ionização dessas substâncias com o aumento da concentração de eletrólitos na fase móvel. Assim, a solução de ácido fórmico 0,1% foi selecionada como fase móvel aquosa.

O solvente utilizado na lavagem interna da agulha do injetor foi avaliado

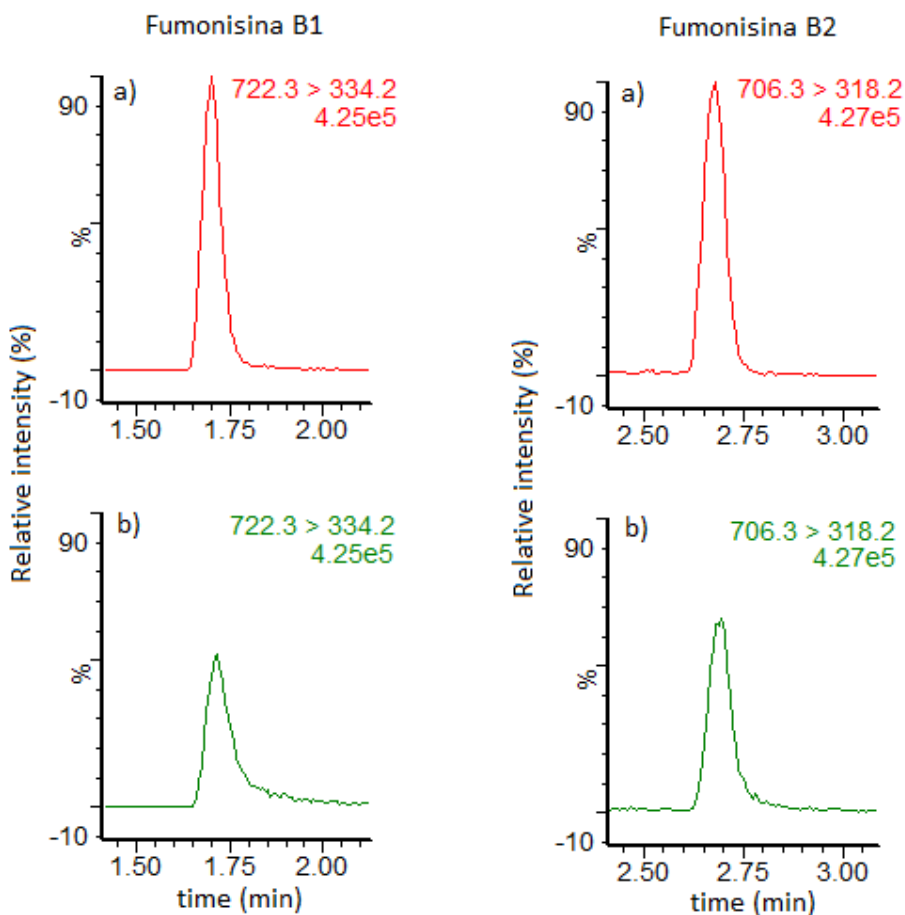
quanto à influência no formato dos picos cromatográficos e na sensibilidade. As condições utilizadas foram metanol: água (1:1, v/v), ácido fórmico 0,1%. Picos com formatos adequados foram observados para todas as condições avaliadas. Não foi observada diferença significativa entre as condições avaliadas em relação à sensibilidade.

5.1.3 Seleção do solvente utilizado no preparo dos padrões

As soluções padrão foram preparadas inicialmente em metanol/água (50:50 v/v). Foram observados picos com calda e baixa resposta para as fumonisinas B1 e B2 quando essas substâncias foram preparadas nessa solução. Como demonstrado na Figura 11, picos cromatográficos simétricos e com maior sensibilidade foram obtidos para essas substâncias com a adição de ácido fórmico 0,1% no preparo das soluções padrão.

Com o objetivo de avaliar a influência na sensibilidade das substâncias alvo, foi avaliada a adição de ácido fórmico (0,1 e 0,3%) no preparo das soluções padrão (metanol/água, 50:50 v/v). Com a adição de ácido fórmico 0,3% foi observado aumento da resposta para fumonisina B2 hidrolisada (9%), fumonisina B2 (49%), fumonisina B1 (51%) e supressão da resposta para fumonisina B1 hidrolisada (- 4%) em relação à solução preparada sem adição de ácido fórmico (metanol/água, 50:50 v/v). Com a adição de ácido fórmico 0,1 % foi observado aumento da resposta para todas as micotoxinas alvo, fumonisina B1 hidrolisada (17%), fumonisina B2 hidrolisada (29%), fumonisina B1 (37%) e fumonisina B2 (46%), em relação à solução preparada sem adição de ácido fórmico. Portanto, essa condição foi selecionada para ser utilizada no método analítico.

Figura 11- Cromatogramas demonstrando o efeito da adição de ácido fórmico no preparo das soluções de FB1 e FB2 (5 ng mL⁻¹): a) soluções padrão preparadas em metanol/água (50:50 v/v) com ácido fórmico 0,1%; b) soluções padrão preparadas sem ácido fórmico (metanol/água, 50:50 v/v).



Fonte: (Do autor, 2017).

5.2 Preparo das amostras

5.2.1 Homogeneidade das amostras

A variabilidade dos resultados das concentrações de micotoxinas em cereais ocorre devido à sua distribuição heterogênea nos grãos, portanto a amostragem é de extrema importância na determinação de micotoxinas (MAZIERO; BERSOT, 2010).

A quantidade de amostra utilizada durante o tratamento das amostras está diretamente relacionada à homogeneidade da amostra. Uma pequena alíquota nem

sempre é considerada representativa para uma determinação precisa de contaminação. Bertuzzi et al. (2016) avaliou a homogeneidade de amostras de grãos de milho utilizando massas de 5 e 20 g de amostra para a extração de fumonisinas B1 e B2 e fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas. As amostras foram moídas, peneiradas em peneira de 1 mm e em seguida homogeneizadas durante 30 minutos. Nos resultados apresentados, a análise a partir de 5 g de amostra não foi satisfatória, com desvio padrão relativo entre 12,6 e 22,4%. No entanto, o resultado foi satisfatório para a análise de produtos à base de milho, o que segundo o autor, pode estar relacionado à homogeneização durante o processamento industrial dos produtos. Já na análise a partir de 20 g de amostra de grão de milho, o desvio padrão relativo foi considerado satisfatório e inferior a 8,1% para 90% das amostras analisadas. No método descrito por Dall' Asta et al. (2008), a análise para extração de fumonisinas e seus derivados hidrolisados em produtos à base de milho foi realizada a partir de uma massa de 25 g de amostra. Em dois métodos descritos por Dall' Asta et al. (2009b) a extração de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas foi realizada a partir de massas de 5 e 0,5 g de amostras de milho não processado, respectivamente. No método descrito por Falavigna et al. (2012) a extração de fumonisinas foi realizada a partir de 5 g de amostra de produtos à base de milho.

No presente estudo foi avaliado a influência do procedimento de homogeneização e a quantidade de amostra analisada na precisão do método. Inicialmente, foi avaliada a menor massa de amostra representativa que poderia ser usada no método de extração das micotoxinas. Por apresentar maiores problemas em relação à homogeneidade comparada aos produtos, a matriz milho pipoca foi selecionada. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6- Estudo da homogeneidade da amostra de milho pipoca (homogeneizada por 1 h) em função da quantidade de amostra analisada.

Massa de amostra (g)	Fumonisina B1 (DPR%), n= 6	Fumonisina B2 (DPR%), n= 6
1	30,1	38,2
5	8,5	10,7
10	7,9	8,4

Fonte: (Do autor, 2017).

DPR%: desvio padrão relativo

Com os resultados obtidos podemos verificar que utilizando massas de

amostra de 5 e 10 g foram obtidos resultados satisfatórios quanto à homogeneidade da amostra, com resultados de coeficientes de variação inferiores a 11%. A menor massa de amostra que apresentou resultados satisfatórios (5 g) foi selecionada devido ao menor gasto de solvente. Para confirmar a homogeneidade utilizando essa quantidade de amostra, 6 alíquotas de mais três amostras de milho de pipoca processadas (homogeneizadas por 1 h) foram analisadas. Todos os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Estudo da homogeneidade da amostra utilizando 5 g de amostra no método de tratamento da amostra.

Amostras analisadas	Fumonisina B1 (DPR%), n= 6	Fumonisina B2 (DPR%), n= 6
#M3	8,5	10,7
#M5	9,6	7,9
#M6	10,2	8,9
#M7	5,6	4,5

Fonte: (Do autor, 2017).

DPR%: desvio padrão relativo

Utilizando os resultados obtidos (Tabela 8) pode-se verificar que o procedimento de homogeneização por 1 h permite maior performance na homogeneidade das amostras, demonstrado através dos DPR% obtidos para as condições estudadas, principalmente para a fumonisina B1. Assim, esta condição foi selecionada para ser utilizada na rotina do processamento das amostras de milho pipoca e produtos à base de milho.

Tabela 8- Avaliação da influência da etapa de homogeneização para as fumonisinas B1 e B2.

Amostras analisadas	Fumonisina B1		Fumonisina B2	
	Homogeneizada por 1 h (n= 6) (DPR%)	Não homogeneizada (n= 6) (DPR%)	Homogeneizada por 1 h (n= 6) (DPR%)	Não homogeneizada (n= 6) (DPR%)
#M3	8,5	12,0	10,7	10,5
#M5	9,6	14,2	7,9	7,4
#M6	10,2	9,2	8,9	11,1
#M7	5,6	10,1	4,5	9,0

Fonte: (Do autor, 2017).

DPR%: desvio padrão relativo

5.2.2 Otimização do método de preparo das amostras

5.2.2.1 Fumonisinias livres

Para a otimização do método de tratamento das amostras foram selecionados métodos descritos na literatura para a determinação de fumonisinias ou para a determinação simultânea de diferentes classes de micotoxinas em alimentos, que utilizam a extração com solventes sob agitação e/ou por ultrassom (extração sólido-líquido). Os resultados obtidos para os procedimentos avaliados são apresentados na Tabela 9. O Método D foi selecionado para validação, pois apresentou melhores resultados (menor erro relativo) em relação aos outros métodos avaliados.

Tabela 9- Recuperações e repetibilidades obtidas para os procedimentos avaliados.

	Metodo A (n= 3)		Metodo B (n= 3)		Metodo C (n= 3)		Metodo D (n= 3)		Metodo E (n= 3)		MetodoF (n= 3)	
	Rec (%)	DPR (%)	Rec (%)	DPR (%)	Rec (%)	DPR (%)	Rec (%)	DPR (%)	Rec (%)	DPR (%)	Rec (%)	DPR (%)
HFB1	93,5	19,8	73,3	2,0	79,0	25,4	108,7	2,7	121,6	2,9	111,5	4,9
FB1	29,4	8,7	61,3	14,6	30,7	12,3	102,1	1,4	74,4	3,0	73,6	0,9
HFB2	94,4	19,4	66,4	1,3	79,5	24,4	110,8	1,9	118,4	4,3	115,8	4,4
FB2	24,9	9,9	50,5	18,0	27,2	13,7	102,8	1,4	74,1	2,3	75,9	0,2

Fonte: (Do autor, 2017).

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2.

DPR: desvio padrão relativo.

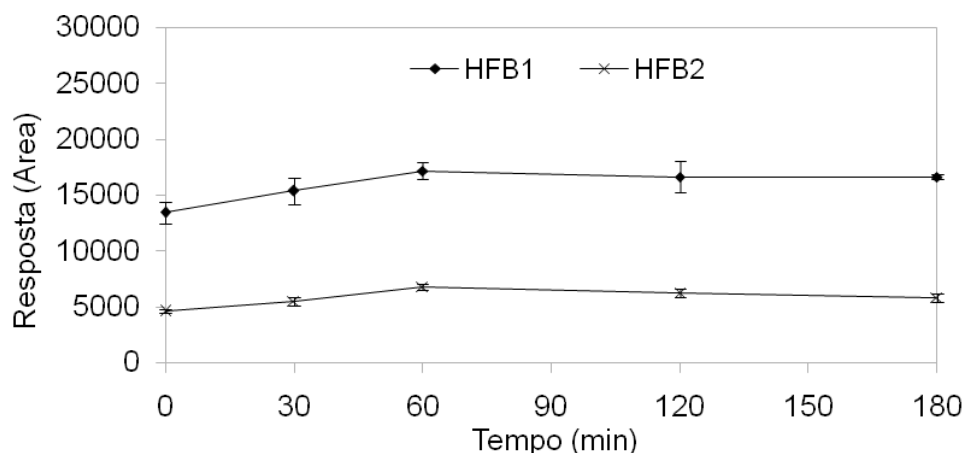
Rec: recuperação.

5.2.2.2 Fumonisinhas totais (após hidrólise alcalina)

Diferentes procedimentos são reportados na literatura para determinação indireta de fumonisinhas totais (livres + ligadas) presentes em amostras de milho e produtos à base de milho, os quais diferem principalmente no tempo empregado na hidrólise (BRYLA et al., 2014; DALL'ASTA et al., 2008, 2009b). Assim, diversos experimentos foram realizados em duplicata para avaliar o tempo necessário para a hidrólise das micotoxinas presentes nas amostras.

Os resultados obtidos são mostrados na Figura 12. As amostras que foram hidrolisadas com um tempo de agitação de 60 minutos demonstraram um aumento significativo de fumonisinhas hidrolisadas em comparação às amostras que foram hidrolisadas por 30 minutos. Já os resultados das amostras hidrolisadas com tempos de agitação a partir de 60 minutos demonstraram que não houve aumento da formação das fumonisinhas hidrolisadas. Assim, o método utilizando 60 min na etapa de hidrólise foi selecionado. O tempo de hidrólise selecionado está de acordo com os tempos de hidrólise utilizados por Dall'Asta et al. (2008, 2009b) e Andrade et al. (2016).

Figura 12- Avaliação do tempo de hidrólise das fumonisinhas.



Fonte: (Do autor, 2017).

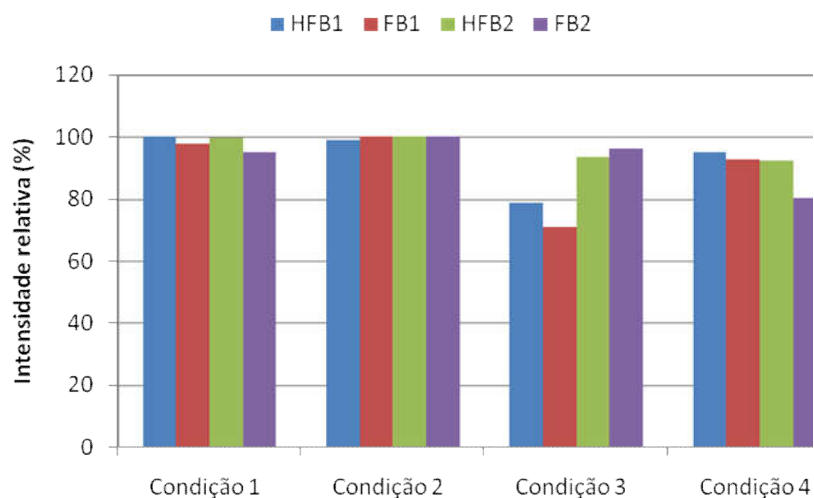
Após a seleção do tempo de hidrólise, a eficiência de extração do método foi avaliada. Para realização desse estudo, uma amostra fortificada com as fumonisinhas B1 e B2 em concentração equivalente a $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ de fumonisinhas B1 e B2

hidrolisadas foi analisada utilizando as condições experimentais descritas anteriormente. Para compensar possível efeito matriz, as recuperações foram determinadas utilizando o extrato da amostra fortificado com as fumonisinas hidrolisadas. Foram obtidas recuperações de 92,6 e 97,8% para as fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas, respectivamente. As recuperações foram consideradas satisfatórias (80 a 110%) e as condições utilizadas no experimento foram utilizadas na validação do método.

5.2.3 Seleção do solvente de diluição do extrato da amostra

A avaliação da sensibilidade em relação às diferentes proporções de solvente foi realizada através da intensidade do sinal de cada substância. Diferentes respostas foram observadas para as substâncias alvo em função dos solventes utilizados na diluição dos extratos (Figura 13). Para todas as substâncias estudadas melhores resultados foram obtidos utilizando as condições 1 e 2, sendo que não houve diferença significativa (< 2%) nas intensidades dos sinais nessas condições em relação as fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas e fumonisina B1; na condição 2 a fumonisina B2, apresentou maior intensidade do sinal. Portanto, as alíquotas diluídas com metanol/ água/ ácido fórmico (50:49,95:0,05, v/v/v) apresentaram maior sensibilidade nas respostas das substâncias alvo em relação as alíquotas diluídas com os demais solventes, sendo esta condição selecionada para ser usada no método analítico.

Figura 13- Intensidades relativas (%) obtidas utilizando diferentes solventes de diluição dos extratos (milho de pipoca).



Fonte: (Do autor, 2017).

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2. Condição 1: metanol/água/ácido fórmico (25:74,95:0,05, v/v/v); condição 2: metanol/água/ácido fórmico (50:49,95:0,05, v/v/v); condição 3: metanol/água/ácido fórmico (75:24,95:0,05, v/v/v); condição 4: solução de ácido fórmico 0,05%.

5.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

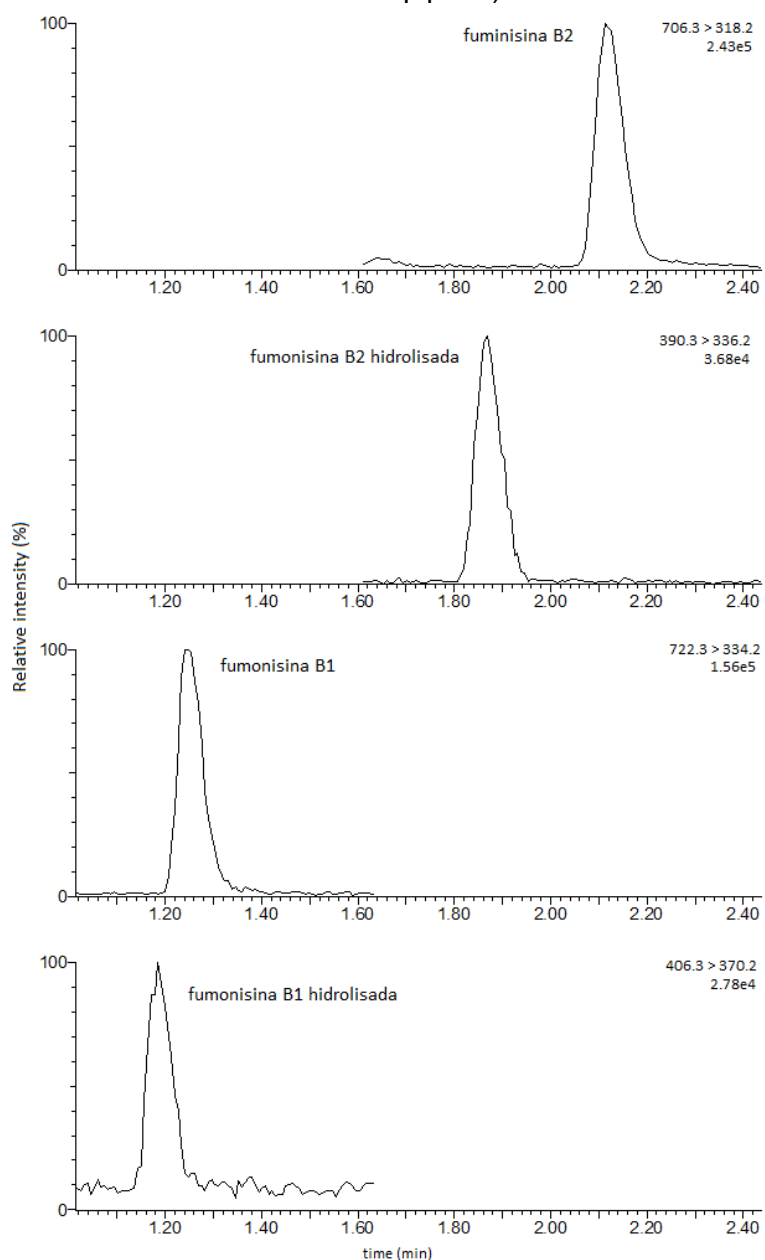
Nesse estudo dois métodos analíticos foram validados, sendo um para a determinação direta de fumonisinas livres e o outro para a determinação indireta de fumonisinas totais (livres + ligadas), pela quantificação das fumonisinas hidrolisadas formadas após hidrólise alcalina em milho pipoca e produtos à base de milho (fubá, farinha de milho, flocos de milho, canjiquinha e canjica branca). Os parâmetros de desempenho dos métodos estudados foram: seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Na validação do método para determinação indireta de fumonisinas totais a matriz milho pipoca foi selecionada como matriz representativa do método.

5.3.1 Seletividade

Os métodos avaliados demonstraram seletividade para todas as micotoxinas em todas as matrizes estudadas. A ausência de sinais interferentes eluindo no

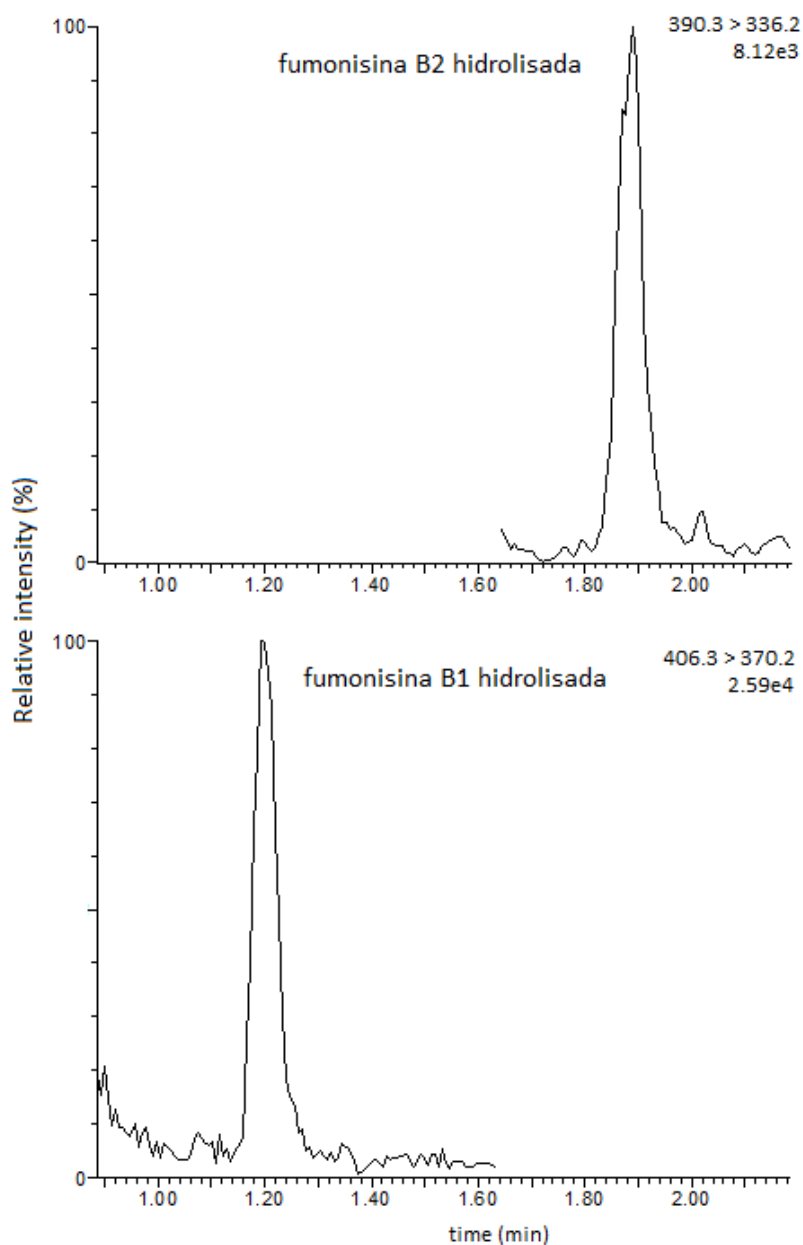
tempo de retenção das micotoxinas foi verificada para todas as matrizes estudadas (milho pipoca, fubá, flocos de milho, farinha de milho, canjica branca e canjiquinha). Nas Figuras 14 e 15 são mostrados os cromatogramas obtidos para amostras de milho pipoca analisadas pelos métodos desenvolvidos nesse estudo.

Figura 14 - Cromatogramas demonstrando a seletividade do método para determinação de fumonisinas livres (fumonisina B1= 1 ng mL⁻¹, fumonisina B2= 1 ng mL⁻¹, fumonisina B1 hidrolisada= 0,1 ng mL⁻¹ e fumonisina B2 hidrolisada= 0,1 ng mL⁻¹ no extrato final de milho pipoca).



Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 15- Cromatogramas demonstrando a seletividade do método para determinação de fumonisinas totais após hidrólise (fumonisina B1 hidrolisada= 0,08 ng mL⁻¹ e fumonisina B2 hidrolisada= 0,015 ng mL⁻¹ no extrato final de milho pipoca).



Fonte: (Do autor, 2017).

5.3.2 Efeito matriz

Para fumonisinas livres foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os coeficientes angulares das curvas de calibração preparadas em matriz e em

solvente para todas as substâncias em todas as matrizes estudadas, exceto para fumonisina B1 hidrolisada (HFB1) em farinha de milho e fumonisina B1 (FB1) em flocos de milho. Apenas para fumonisina B1 hidrolisada (HFB1) não foi observado diferença significativa entre as inclinações de todas as curvas de calibração preparadas em matriz.

Para fumonisinias totais, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os coeficientes angulares das curvas em matriz e solvente para as duas substâncias alvo (HFB1 e HFB2) na matriz flocos, fubá e milho pipoca. Para canjiquinha, curau e canjica branca, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para no mínimo uma substância alvo. Para farinha de milho não foi observado diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os coeficientes angulares das substâncias alvo. Somente para fumonisina B1 hidrolisada (HFB1), não foi observado diferença entre as inclinações de todas as curvas de calibração preparadas em matriz.

Todas as premissas (homocedasticidade, independência, normalidade dos resíduos e ajuste ao modelo linear) das curvas de calibração utilizadas na realização desta análise foram atendidas, seguindo estritamente o protocolo de avaliação descrito na avaliação da linearidade. Os resultados obtidos pela análise de covariância (ANCOVA) para fumonisinias livres e totais em todas as matrizes estudadas, são mostrados nas tabelas 10 e 11.

A extensão do efeito matriz sobre as fumonisinias livres e totais nas diferentes matrizes está demonstrada nas tabelas 12 e 13.

Tabela 10- Resultados de p -valor encontrados para fumonisinas livres na comparação das curvas analíticas em solvente com as matrizes estudadas.

Micotoxinas	^a (p -valor)							^b (p -valor)
	Flocos	Farinha	Canjiquinha	Curau	Fubá	Milho pipoca	Canjica branca	
HFB1	0,00	0,06	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,52
FB1	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HFB2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
FB2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00

Fonte: (Do autor, 2017).

^aobtido pela análise de covariância comparando as inclinações da curva de calibração em matriz com as inclinações da curva de calibração em solvente; ^bobtido pela análise de covariância comparando todas as inclinações das curvas de calibração preparadas em matriz. Para p -valor > 0,05, não há diferença significativa entre as inclinações das curvas de calibração avaliadas com um grau de confiança de 95%.

Tabela 11- Resultados de p -valor encontrados para fumonisinas totais na comparação das curvas analíticas em solvente com as matrizes estudadas.

Micotoxinas	^a (p -valor)							^b (p -valor)
	Flocos	Farinha	Canjiquinha	Curau	Fubá	Milho pipoca	Canjica branca	
HFB1	0,00	0,12	5,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14
HFB2	0,00	0,22	0,00	2,69	0,00	0,00	0,31	0,00

Fonte: (Do autor, 2017).

^aobtido pela análise de covariância comparando as inclinações da curva de calibração em matriz com as inclinações da curva de calibração em solvente; ^bobtido pela análise de covariância comparando todas as inclinações das curvas de calibração preparadas em matriz. Para p -valor > 0,05, não há diferença significativa entre as inclinações das curvas de calibração avaliadas com um grau de confiança de 95%.

Tabela 12- Extensão do efeito matriz sobre as fumonisinas livres nas matrizes estudadas.

Micotoxinas	Efeito Matriz (%) ^a						
	Flocos	Farinha	Canjiquinha	Curau	Fubá	Milho pipoca	Canjica branca
HFB1	23	30	36	33	31	38	36
FB1	11	46	38	39	33	24	29
HFB2	25	37	40	35	37	44	36
FB2	32	45	39	35	74	24	17

Fonte: (Do autor, 2017).

a (+) aumento do sinal; (-) supressão do sinal.

Tabela 13- Extensão do efeito matriz sobre as fumonisinas totais nas matrizes estudadas.

Micotoxinas	Efeito Matriz (%) ^a						
	Flocos	Farinha	Canjiquinha	Curau	Fubá	Milho pipoca	Canjica branca
HFB1	-19	-5	-3	-10	-26	-34	-7
HFB2	-13	2	4	0	-19	-28	1

Fonte: (Do autor, 2017).

a (+) aumento do sinal; (-) supressão do sinal.

Em relação ao método utilizado para a determinação de fumonisinas livres, foi observado aumento de sinal para todas as substâncias alvo em todas as matrizes estudadas, demonstrando que a matriz favorece a ionização dessas substâncias. Resultados semelhantes foram encontrados por Spanjer, Rensen e Scholten (2008) em cereais matinais, e por Li et al. (2012) em milho não processado, nos quais foi verificado o aumento de sinal para as fumonisinas B1 e B2 nas análises por CLAE-EM/EM.

Para o método utilizado na determinação de fumonisinas totais, foi verificado a supressão do sinal analítico da fumonisina B1 hidrolisada (HFB1) em todas matrizes estudadas, demonstrando que a presença da matriz diminui a ionização para essa substância. Para fumonisina B2 hidrolisada (HFB2) a supressão do sinal foi verificada apenas em flocos, fubá e milho pipoca.

Para compensar o efeito matriz as amostras analisadas foram quantificadas em curvas de calibração construídas em matriz.

5.3.3 Linearidade

Na avaliação da linearidade das curvas analíticas, a homocedasticidade dos resíduos, verificada pelo teste de Levene modificado (BROWN; FORSYTHE, 1974), foi confirmada para todas as curvas avaliadas (p -valores >0.05). A independência dos resíduos, foi avaliada pela estatística de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1951), e confirmada para todas as curvas de calibração avaliadas (p -valores $> 0,05$). A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner (RYAN; JOINER, 1976), e também foi confirmada (p -valores $>0,05$). Foram verificadas alta significância da regressão (p -valores <0.001) e falta de ajuste não significante (p -valores >0.05) pela análise de variância (ANOVA) (DRAPER; SMITH, 1998), demonstrando a linearidade das curvas de calibração avaliadas.

5.3.4 Exatidão e Precisão

Os resultados obtidos para milho pipoca estão demonstrados nas Tabelas 14 e 15, onde a repetibilidade e a precisão intermediária são expressas pelo desvio padrão relativo (DPR%) e a exatidão pelos valores de recuperação percentual. Os resultados obtidos foram avaliados de acordo com os critérios adotados na União Europeia (CE, 2002, 2006b). Os valores de recuperação encontrados, utilizando o método de determinação direta de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas, foram entre 93,2 e 110,5%, com DPR inferior a 10% para todas as micotoxinas em condições de repetibilidade (mesmo dia e mesmo analista). O DPR obtido para o estudo de precisão intermediária foi menor do que 14% para as micotoxinas estudadas. Já os valores de recuperação encontrados, utilizando o método de determinação indireta de fumonisinas totais (após hidrólise), foram entre 92,1 e 105,5%, com DPR em condições de repetibilidade inferior a 8%, e o DPR obtido para o estudo de precisão intermediária, inferior a 5%, atendendo aos critérios de aceitação estabelecidos pela Comunidade Europeia.

Os valores de recuperação encontrados para produtos à base de milho foram entre 89,3 e 109,7% para o método de determinação direta de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas, com DPR inferior a 7% para todas as micotoxinas estudadas. Os resultados obtidos estão demonstrados nas Tabelas 16 a 21.

Assim, podemos considerar que os métodos desenvolvidos apresentaram

exatidão e precisão adequados para todas as matrizes estudadas.

5.3.5 Limite de detecção e Limite de quantificação

Para a determinação dos limites de quantificação e detecção, inicialmente foram analisadas no mínimo dez amostras de cada matriz com o objetivo de obter amostras não contaminadas (branco) ou com baixos níveis de contaminação para todas as micotoxinas.

Na ausência de amostras branco, amostras com os menores níveis de contaminação, quantificadas pelo método de adição padrão para compensar o efeito de matriz, foram utilizadas para determinar as razões de sinal/ruído. No método de adição padrão foram utilizados no mínimo cinco níveis de concentração e a linearidade das curvas de calibração foi avaliada e confirmada seguindo o procedimento descrito nos estudos de linearidade (descrito anteriormente). Os resultados obtidos estão demonstrados nas Tabelas 14 a 21.

Tabela 14- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de milho pipoca.

Micotoxinas	LD	LQ	200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ^c			2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ^c		4000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ^c		6000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ^c	
			Rec	^a DPR	^b DPR	Rec	^a DPR	Rec	^a DPR	Rec	^a DPR
HFB1	1,39	4,6	104,2	3,4	10,0	102,2	6,2	109,8	9,6	105,5	3,0
FB1	1,08	3,6	103,9	3,4	13,8	97,3	4,7	100,0	0,7	97,6	3,7
HFB2	0,70	2,3	93,2	4,1	10,4	103,7	6,0	110,5	9,4	105,9	3,3
FB2	0,40	1,3	94,4	4,7	10,4	96,2	2,2	97,0	2,4	94,3	3,5

Fonte: (Do autor, 2017).

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; LD, Limite de detecção ($\mu\text{g kg}^{-1}$); LOQ, Limite de quantificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$); Rec (%), recuperação; ^aDPR (%) desvio padrão relativo (intra-day, n= 6); ^bDPR (%) desvio padrão relativo (inter-day, n= 6 dias); ^cConcentração fortificada dez vezes menor para as fumonisinas hidrolisadas.

Tabela 15- Validação do método utilizado na determinação indireta de fumonisinas totais (após hidrólise alcalina) em milho pipoca.

Micotoxinas	LD	LQ	200 µg kg ⁻¹ ^c			2000 µg kg ⁻¹ ^c		4000 µg kg ⁻¹ ^c	
			Rec	^a DPR	^b DPR	Rec	^a DPR	Rec	^a DPR
HFB1	0,63	2,1	92,1	7,6	3,8	103,0	1,8	101,6	3,6
HFB2	0,11	0,4	96,4	3,9	4,7	105,5	3,5	104,3	5,5

Fonte: (Do autor, 2017).

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; LD, Limite de detecção (µg kg⁻¹); LQ, Limite de quantificação (µg kg⁻¹); Rec(%), recuperação; ^aDPR (%) desvio padrão relativo (intra-day, n=6); ^bDPR (%) desvio padrão relativo (inter-day, n= 6 dias). ^cConcentração obtida para as fumonisinas hidrolisadas (amostras fortificadas com as fumonisinas B1 e B2). LD e LQ correspondentes: FB1 (LD= 1,12 µg kg⁻¹; LQ= 3,7 µg kg⁻¹); FB2 (LD= 0,21 µg kg⁻¹; LQ= 0,7 µg kg⁻¹).

Tabela 16- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de flocos de milho.

Micotoxinas	LD	LQ	2000 µg kg ⁻¹ ^c	
			Rec	^a DPR
HFB1	1,07	3,6	98,0	3,4
FB1	0,43	1,43	109,5	2,4
HFB2	0,58	1,9	99,6	2,7
FB2	0,19	0,6	106,7	1,5

Fonte: (Do autor, 2017).

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; LD, Limite de detecção (µg kg⁻¹); LOQ, Limite de quantificação (µg kg⁻¹); Rec (%), recuperação; ^aDPR (%) desvio padrão relativo (intra-day, n= 6); ^bDPR (%) desvio padrão relativo (inter-day, n= 6 dias); ^cConcentração fortificada dez vezes menor para as fumonisinas hidrolisadas.

Tabela 17- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de farinha de milho.

Micotoxinas	LD	LQ	2000 µg kg ⁻¹ ^c	
			Rec	^a DPR
HFB1	1,08	3,6	89,3	3,7
FB1	1,98	6,59	100,3	6,0
HFB2	0,57	1,9	93,8	3,5
FB2	1,37	4,6	99,1	5,2

Fonte: (Do autor, 2017).

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; LD, Limite de detecção (µg kg⁻¹); LOQ, Limite de quantificação (µg kg⁻¹); Rec (%), recuperação; ^aDPR (%) desvio padrão relativo (intra-day, n= 6); ^bDPR (%) desvio padrão relativo (inter-day, n= 6 dias); ^cConcentração fortificada dez vezes menor para as fumonisinas hidrolisadas.

Tabela 18- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de fubá.

Micotoxinas	LD	LQ	2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ^c	
			Rec	^a DPR
HFB1	0,98	3,3	95,2	4,9
FB1	1,11	3,70	102,9	1,5
HFB2	0,45	1,5	97,5	5,3
FB2	0,74	2,5	100,5	3,5

Fonte: (Do autor, 2017).

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; LD, Limite de detecção ($\mu\text{g kg}^{-1}$); LOQ, Limite de quantificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$); Rec (%), recuperação; ^aDPR (%) desvio padrão relativo (intra-day, n= 6); ^bDPR (%) desvio padrão relativo (inter-day, n= 6 dias); ^cConcentração fortificada dez vezes menor para as fumonisinas hidrolisadas.

Tabela 19- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de canjiquinha.

Micotoxinas	LD	LQ	2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ^c	
			Rec	^a DPR
HFB1	0,91	3,0	90,6	5,0
FB1	1,32	4,42	100,6	3,6
HFB2	0,54	1,8	90,4	4,4
FB2	0,55	1,8	95,4	4,5

Fonte: (Do autor, 2017).

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; LD, Limite de detecção ($\mu\text{g kg}^{-1}$); LOQ, Limite de quantificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$); Rec (%), recuperação; ^aDPR (%) desvio padrão relativo (intra-day, n= 6); ^bDPR (%) desvio padrão relativo (inter-day, n= 6 dias); ^cConcentração fortificada dez vezes menor para as fumonisinas hidrolisadas.

Tabela 20- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de canjica branca.

Micotoxinas	LD	LQ	2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ^c	
			Rec	^a DPR
HFB1	0,93	3,1	107,8	3,6
FB1	0,40	1,33	109,7	3,0
HFB2	0,59	2,0	108,3	2,8
FB2	0,86	2,9	108,5	4,0

Fonte: (Do autor, 2017).

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; LD, Limite de detecção ($\mu\text{g kg}^{-1}$); LOQ, Limite de quantificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$); Rec (%), recuperação; ^aDPR (%) desvio padrão relativo (intra-day, n= 6); ^bDPR (%) desvio padrão relativo (inter-day, n= 6 dias); ^cConcentração fortificada dez vezes menor para as fumonisinas hidrolisadas.

Tabela 21- Validação do método de fumonisinas livres utilizado na determinação de fumonisinas e fumonisinas hidrolisadas naturalmente presentes nas amostras de curau de milho.

Micotoxinas	LD	LQ	2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ^c	
			Rec	^a DPR
HFB1	0,72	2,4	96,6	5,5
FB1	0,45	1,5	102,9	6,8
HFB2	0,36	1,2	106,9	5,4
FB2	0,37	1,2	107,9	3,4

Fonte: (Do autor, 2017).

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; LD, Limite de detecção ($\mu\text{g kg}^{-1}$); LOQ, Limite de quantificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$); Rec (%), recuperação; ^aDPR (%) desvio padrão relativo (intra-day, n= 6); ^bDPR (%) desvio padrão relativo (inter-day, n= 6 dias); ^cConcentração fortificada dez vezes menor para as fumonisinas hidrolisadas.

Os valores obtidos nesse estudo para os limites de quantificação em milho pipoca e produtos à base de milho foram menores que os valores obtidos em estudos realizados por Dall'Asta et al. (2008) ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fumonisina B1 e B2, $70 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas) e Bryla et al. (2016) ($12,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fumonisinas B1 e B2 e fumonisina B1 hidrolisada; e $14 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fumonisina B2 hidrolisada). As sensibilidades obtidas nesse estudo foram consideradas adequadas para análises de amostras na rotina, atendendo aos limites máximos tolerados para as fumonisinas B1 e B2 em milho e produtos à base de milho.

5.4 Análise das amostras

Os métodos analíticos validados para determinação de fumonisinas livres e fumonisinas totais respectivamente, foram aplicados nas análises de 212 amostras de milho pipoca e produtos à base de milho, adquiridos das regiões Norte, Nordeste, Sul, Sudeste, Centro-Oeste do Brasil. Os resultados foram avaliados de acordo com os limites máximos toleráveis (LMT) da RDC n° 07/2011 (BRASIL, 2011). Na Figura 22 são mostrados os cromatogramas de uma amostra de milho pipoca, naturalmente contaminada com as micotoxinas alvo. Os resultados encontrados das amostras para as fumonisinas livres, fumonisinas mascaradas e fumonisinas totais são mostrados respectivamente nos Apêndices A, B, C e D.

Na Tabela 22 constam resumidamente os resultados encontrados nas análises de milho pipoca e produtos à base de milho. As fumonisinas B1 e B2 hidrolisadas foram encontradas em 20 (9,4%) e 4 (1,9%) das amostras analisadas,

respectivamente. As fumonisinas B1 e B2 foram encontradas em 100% das amostras analisadas, em níveis de concentração de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $1727,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ e de $2,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $436 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O somatório das fumonisinas B1 e B2 foi encontrado em níveis entre $7,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ (canjica branca) e $2158,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ (fubá) com uma média de $301,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ para todas as amostras analisadas. Os níveis encontrados não excederam o LMT de acordo com a RDC n° 07/2011.

Tabela 22- Resultados da contaminação encontrada para as fumonisinas livres nas 212 amostras de milho pipoca e produtos à base de milho ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Micotoxinas	Concentração média (faixa de concentração, $\mu\text{g kg}^{-1}$)				
	HFB1	FB1	HFB2	FB2	FB1 + FB2
Milho pipoca (n=50)	6,8 (<1,39 (LD) –10,6)	201,5 (10,7–946,7)	3,2 (<0,70 (LD) –4,0)	54,2 (3,6–300)	255,7 (15,1–1246,7)
Fubá (n=50)	6,0 (<0,98 (LD) –8,9)	440,9 (31,7–1727,3)	1,7 (<0,45 (LD) –1,7)	110,0 (7,5–436)	550,9 (39,2–2158,2)
Flocos/farinha flocada (n=49)	4,9 (<1,07 (LD) –5,8)	212,4 (9,4–814)	2,1 (<0,58 (LD) –2,1)	55,2 (2,6–227,4)	267,6 (12– 990,5)
Farinha (n=18)	<LD	143,3 (30,6–455,1)	<LD	54,8 (12–152,3)	198,1 (42,5–607,4)
Canjiquinha (n=21)	<LD	128,9 (8,2–364,5)	<LD	33,6 (2,7–101,4)	162,5 (10,9–465,9)
Canjica branca (n=15)	<LD	49,9 (5–123,8)	<LD	14,8 (3–36,6)	63,9 (7,2–160,3)
Curau de milho* (n=9)	<LD	229,5 (17,2 – 652,5)	<LD	63,2 (4,2–190,8)	292,7 (22–843,3)

Fonte: (Do autor, 2017).

*Alimento à base de açúcar, água, leite ou leite de coco, feito com milho moído no estágio leitoso (antes da maturação e secagem do grão); HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2; LD: Limite de detecção.

Os maiores níveis de contaminação de fumonisinas foram encontrados em amostras de fubá, com média de 550,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e níveis de concentração de 39,2 a 2158,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório de fumonisinas (B1 + B2).

Diversos estudos têm reportado maiores níveis de contaminação de fumonisinas em fubá em relação a outros produtos à base de milho no Brasil. Em estudo realizado por Caldas e Silva (2007) com 208 amostras de produtos à base de milho, o fubá apresentou os maiores níveis de contaminação por fumonisinas, com concentração máxima de 4740 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para fumonisina B1 e concentração média de 2040 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório de fumonisinas (B1 + B2). Martins et al. (2012) analisaram 100 amostras de milho e produtos à base de milho, a maior média de contaminação foi encontrada em fubá, com 601 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório de fumonisinas (B1 + B2). Savi et al. (2016) analisaram 95 amostras de milho e produtos à base de milho, a maior concentração média foi encontrada em fubá, com 1956 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório de fumonisinas (B1 + B2). Em estudo realizado por Bordin et al. (2014) com 120 amostras de produtos à base de milho, a maior concentração média de fumonisina B1 foi encontrada em fubá, com 474,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

As fumonisinas também foram encontradas em fubá com altos níveis de concentração em outros países. Nos Estados Unidos, em estudo realizado com 56 produtos à base de milho, os produtos com maiores teores de fumonisina B1 foram o fubá de milho branco e fubá de milho amarelo, com concentrações máximas de 5916 e 2289 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (CASTELO; SUMNER; BULLERMAN, 1998). Em estudo realizado na Turquia com 82 amostras de produtos à base de milho, o nível mais alto de fumonisina B1 também foi encontrado em fubá, com concentração de 2660 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (OMURTAG, 2001).

Em nosso estudo, das 50 amostras de fubá analisadas, 28 amostras foram de fubá mimoso (provenientes da moagem do grão degerminado) e 22 amostras de fubá comum (provenientes da moagem do grão integral). As faixas de concentrações encontradas para o somatório das fumonisinas B1 e B2 nas amostras de fubá mimoso e fubá integral foram de 94,4 a 1980,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com média de 610,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e de 39,2 a 2158,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com média de 475,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Os maiores níveis de concentração para as fumonisinas foram encontrados em fubá integral em comparação com fubá mimoso, o que está de acordo com estudos previamente reportados na literatura (BRERA et al., 2004; KATTA et al., 1997; PIETRI; ZANETTI; BERTUZZI, 2009).

O milho pipoca apresentou uma faixa de concentração de 15,1 a 1246,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório das fumonisinas B1 e B2, com média de 255,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No Brasil, em estudo realizado por Savi et al. (2016), a média encontrada para o somatório das fumonisinas em 10 amostras de milho pipoca foi de 121 $\mu\text{g kg}^{-1}$, menor que a média encontrada em nosso estudo. Já em estudo realizado por Martins et al. (2012) com 17 amostras de milho pipoca, a concentração média encontrada para o somatório das fumonisinas foi de 446 $\mu\text{g kg}^{-1}$, superior à média encontrada em nosso estudo.

As fumonisinas também têm sido encontradas em milho pipoca em outros países. Em Portugal, em estudo realizado com 49 amostras de milho pipoca, a concentração máxima encontrada para fumonisina B1 foi de 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, inferior a concentração máxima (946,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$) encontrada para fumonisina B1 no nosso estudo (MARTINS et al., 2008). Na Polônia, em estudo realizado com 13 amostras de milho pipoca, a concentração máxima para o somatório das fumonisinas B1 e B2 foi de 763 $\mu\text{g kg}^{-1}$, inferior a concentração máxima (1246,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para o somatório de fumonisinas encontrado em nosso estudo (KOWALSKA; HAJOK; PIEKUT, 2017).

Para farinha flocada ou flocos de milho, as concentrações encontradas para o somatório das fumonisinas foram na faixa de 12 a 990,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com média de 267,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A média encontrada neste estudo foi menor que a média (1307 $\mu\text{g kg}^{-1}$) encontrada por Scaff e Scussel (2004) para o somatório de fumonisinas em 11 amostras de flocos de milho pré-cozidos comercializados em Santa Catarina.

Para farinha de milho torrada a faixa de concentração encontrada para o somatório de fumonisinas foi entre 42,5 e 607,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com média de 198 $\mu\text{g kg}^{-1}$, inferior as médias encontradas por Martins et al. (2012) e Caldas e Silva (2007). Martins et al. (2012) analisaram 15 amostras de farinha de milho e encontraram uma média de 268 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório das fumonisinas B1 e B2. Já em estudo realizado por Caldas e Silva (2007) foi encontrado uma média de 653 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório de fumonisinas em 21 amostras de farinha de milho.

Para canjiquinha as concentrações encontradas foram de 10,9 a 465,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com média de 162,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório de fumonisinas B1 e B2. As médias encontradas em nosso estudo foram inferiores as médias encontradas por Martins et al. (2012) e Savi et al. (2016). Martins et al. (2012) analisaram 28 amostras de grits de milho (canjica), e encontraram uma média de 440 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório de fumonisinas B1 e B2. Savi et al. (2016) analisaram 15 amostras de grits de milho e

encontraram uma média de 1105 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório de fumonisinas B1 e B2. Na Argentina em estudo realizado com 75 amostras de diferentes frações do grão do milho, a média de concentração encontrada em grits de milho foi de 174,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com concentrações máximas de 457 e 155 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para fumonisinas B1 e B2, próximas às concentrações máximas de 364,5 e 101,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ encontradas neste estudo para as fumonisinas B1 e B2, respectivamente (BROGI et al., 2002).

A canjica branca foi o alimento com os menores níveis de contaminação por fumonisinas. As concentrações encontradas para o somatório das fumonisinas B1 e B2 foram de 7,2 a 160,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com média de 63,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$, inferiores as concentrações reportadas por Kawashima e Soares (2006) e Lino et al. (2006). No Brasil, em estudo realizado com 9 amostras de canjica branca (usadas para preparo de munguzá), a concentração encontrada para fumonisina B1 foi de 20 a 530 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com média de 190 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (KAWASHIMA; SOARES, 2006). Em Portugal, Lino et al. (2006) analisaram 2 amostras de milho branco (utilizado na preparação de cachupa, prato tradicional), e encontraram uma concentração de 113 a 1162 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com média de 638 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório das fumonisinas B1 e B2.

Para curau de milho, o somatório das fumonisinas B1 e B2 foi entre 22 e 843 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com média de 292,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foi encontrado apenas um estudo sobre fumonisinas em curau de milho no Brasil. Machinski e Soares (2000) analisaram 2 amostras de curau de milho e não detectaram fumonisinas nas amostras analisadas.

Para a análise de fumonisinas totais foram selecionadas 87 amostras de milho pipoca e produtos à base de milho com os maiores níveis de contaminação por fumonisinas B1 e B2 livres.

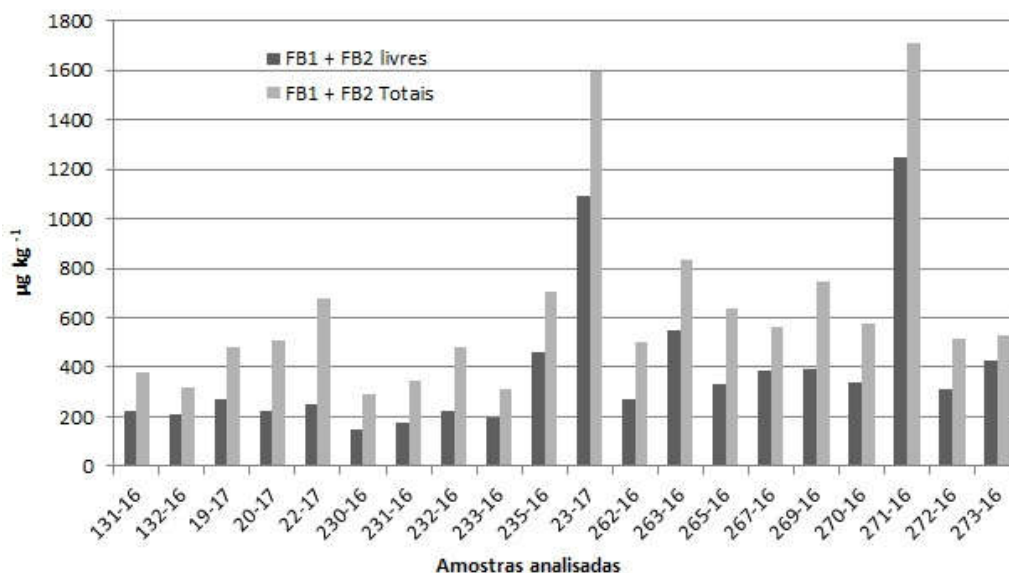
Os níveis de concentração encontrados para as fumonisinas (B1 + B2) totais (livres + mascaradas) variaram de 145 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (canjiquinha) a 2813 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (fubá), com média de 638,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$, considerando todas as amostras analisadas.

Neste estudo, as concentrações de fumonisinas (B1 + B2) totais encontradas nas amostras analisadas foram de 1,1 a 2,7 vezes maiores que as concentrações encontradas para as fumonisinas livres, com uma média de 1,5 vezes maior. Níveis maiores foram encontrados por Dall'Asta et al. (2008) e Oliveira et al. (2015) nas análises de fumonisinas totais. Em estudo reportado por Dall' Asta et al. (2008) com produtos à base de milho, a quantidade de fumonisina B1 total liberada após hidrólise alcalina foi encontrada em níveis até quatro vezes maiores que a concentração de fumonisina B1 livre. Em estudo realizado por Oliveira et al. (2015)

com milho não processado, os níveis encontrados para fumonisinas totais (B1 + B2) foram de 1,5 a 3,8 vezes maiores que as concentrações de fumonisinas livres (B1 + B2).

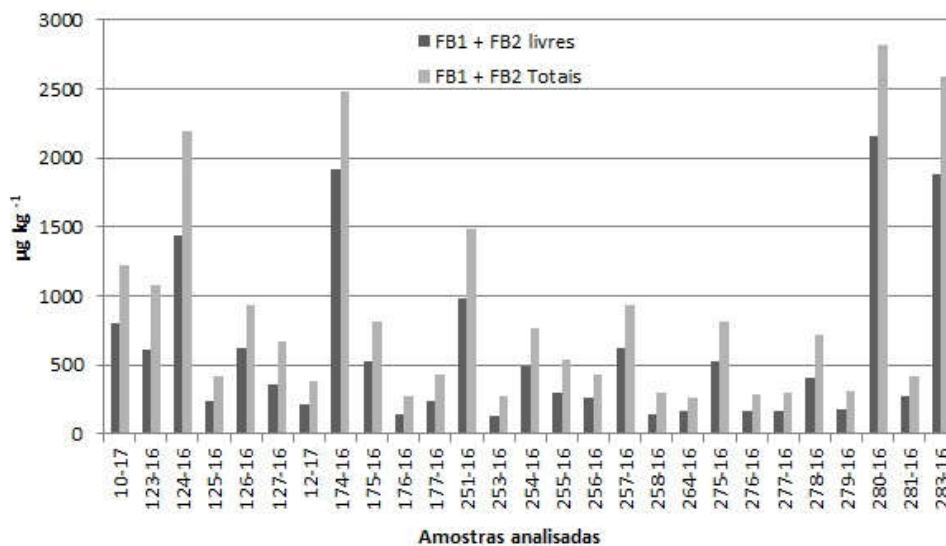
A comparação entre os resultados de fumonisinas livres e fumonisinas totais em milho pipoca, fubá, flocos, farinha, curau e canjiquinha de milho são mostradas nas figuras 16 a 21.

Figura 16 - Resultados do somatório (FB1 + FB2) livres e totais em milho pipoca



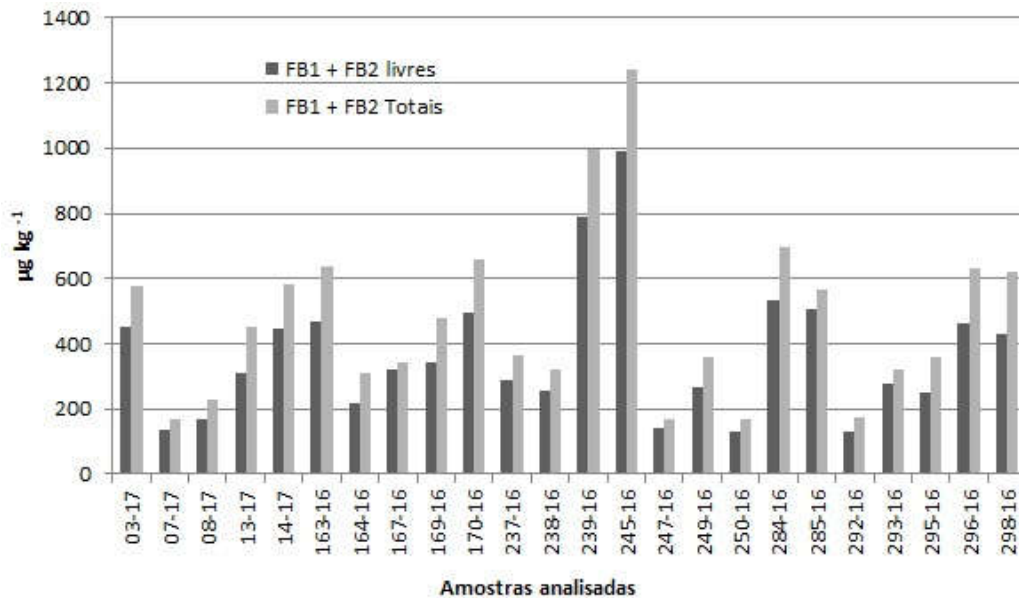
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 17- Resultados do somatório (FB1 + FB2) livres e totais em fubá



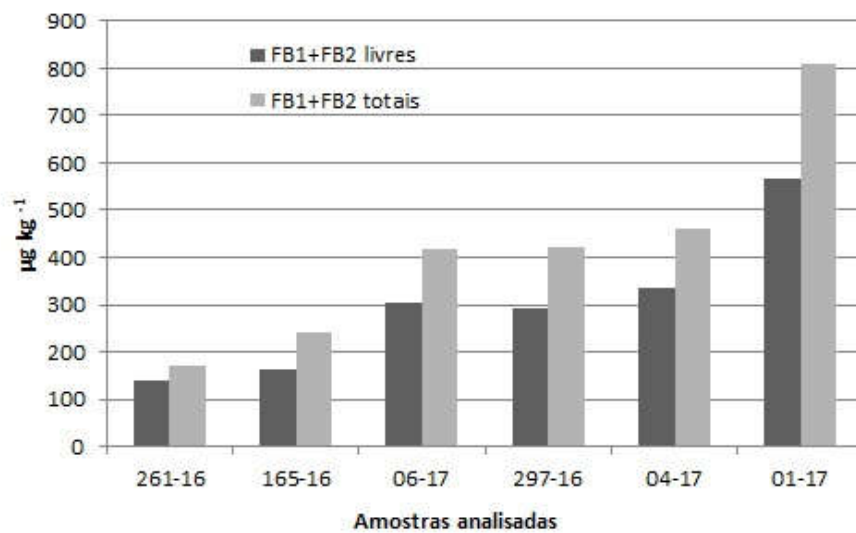
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 18- Resultados do somatório (FB1 + FB2) livres e totais em flocos de milho



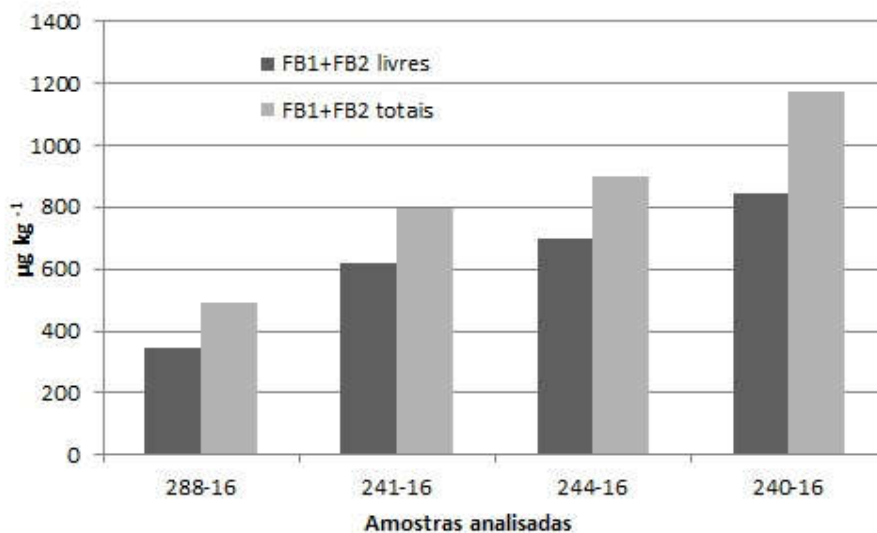
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 19- Resultados do somatório (FB1 + FB2) livres e totais em farinha de milho



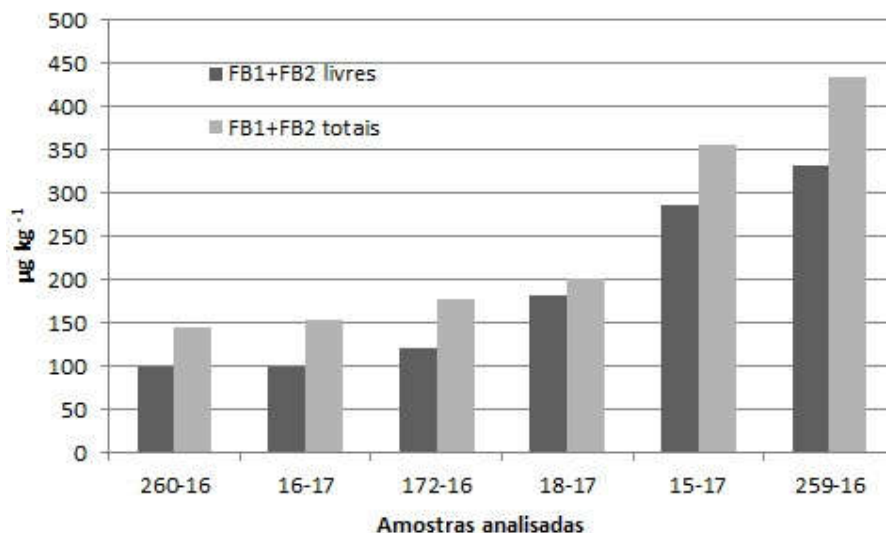
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 20- Resultados do somatório (FB1 + FB2) livres e totais em curau de milho



Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 21- Resultados do somatório de (FB1 + FB2) livres e totais em canjiquinha de milho



Fonte: (Do autor, 2017).

As fumonisinas mascaradas foram determinadas pela diferença entre as concentrações encontradas para as fumonisinas livres e fumonisinas totais.

Os níveis de concentração encontrados para as fumonisinas (B1 + B2) mascaradas variaram de 19,2 µg kg⁻¹ (canjiquinha) a 750,8 µg kg⁻¹ (fubá), com média de 203,3 µg kg⁻¹, considerando todas as amostras analisadas.

As razões encontradas entre as fumonisinas (B1 + B2) mascaradas e livres

variaram de 0,07 a 1,73 considerando todas as amostras analisadas. Em um estudo publicado recentemente no Brasil por Andrade (2016), com milho pipoca, milho degerminado e produtos à base de milho (salgadinhos de milho, fubá, canjiquinha, farinha de milho, amido de milho, massa de milho e cereais matinais) a razão máxima encontrada de fumonisinas mascaradas em relação as fumonisinas livres foi de aproximadamente 0,7, inferior à razão máxima de 1,73 encontrada neste estudo. A comparação entre as razões encontradas de fumonisinas (B1 + B2) mascaradas/livres em milho pipoca, fubá, flocos, canjiquinha, farinha e curau de milho são mostradas na Tabela 23.

Tabela 23- Comparação das razões encontradas de fumonisinas (B1 + B2) mascaradas/livres nos diferentes alimentos

Alimento	Faixa	Média
Milho pipoca	0,25 - 1,73	0,77
Fubá	0,29 - 1,03	0,66
Flocos	0,07 - 0,45	0,30
Farinha de milho	0,22 - 0,48	0,39
Canjiquinha	0,11 - 0,53	0,35
Curau	0,28 - 0,42	0,35

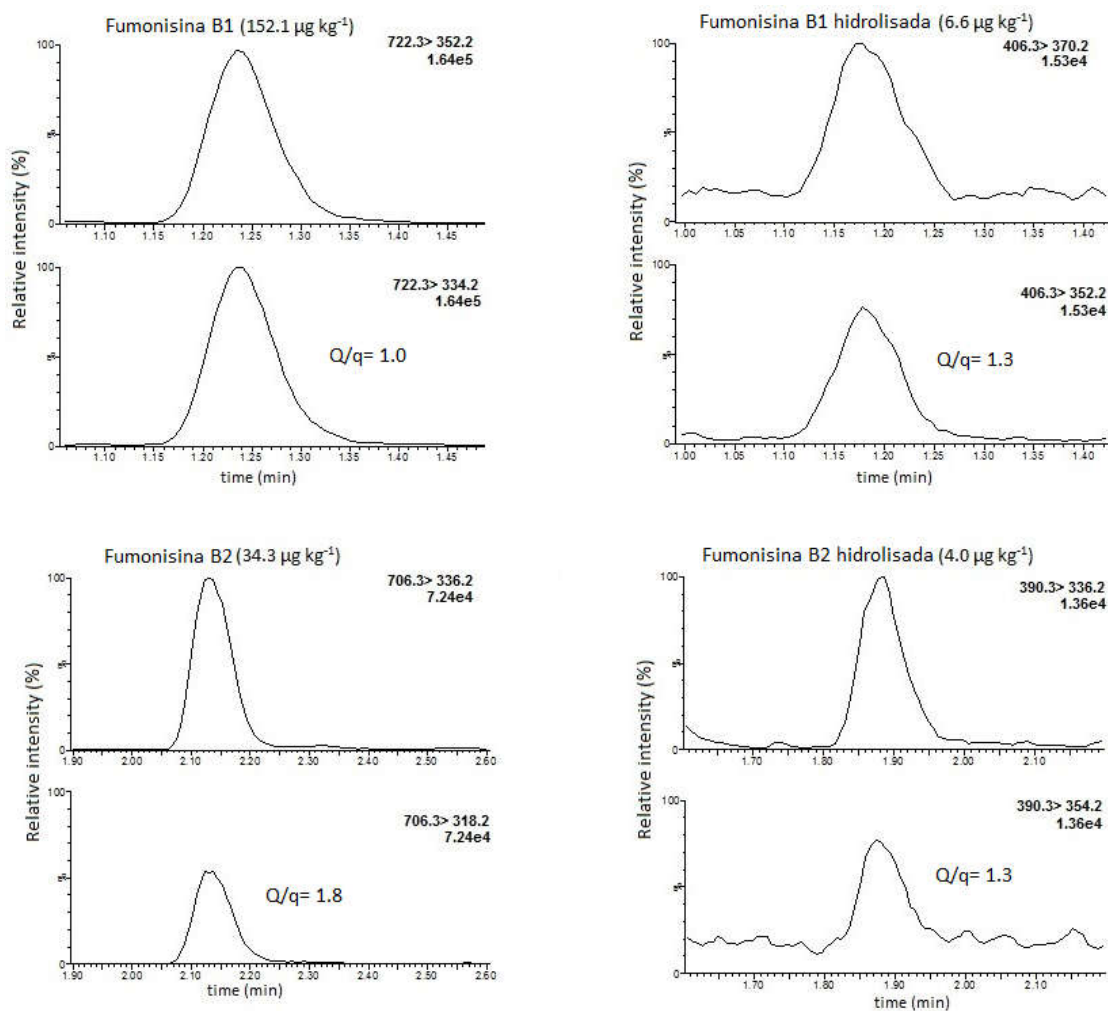
Fonte: (Do autor, 2017).

Estudos reportados anteriormente (BRYLA et al., 2016; DALL' ASTA et al., 2008; PARK et al., 2004) relataram o processamento térmico de alimentos, como o principal meio de formação de fumonisinas mascaradas. Entretanto, no presente estudo, as maiores proporções de fumonisinas mascaradas em relação às fumonisinas livres foram encontradas para milho pipoca e fubá, produtos não processados termicamente. Esses resultados estão de acordo com estudos reportados por Dall' Asta (2009b, 2010) e Oliveira et al. (2015) que também relataram uma alta contaminação de fumonisinas mascaradas em milho não processado. De acordo com os autores, até o momento, as reações responsáveis pela ocorrência natural de fumonisinas mascaradas são desconhecidas, sendo provável que outros mecanismos como a própria desintoxicação das plantas, influenciem nesse mascaramento.

Segundo a RDC n° 138/2017, regulamentação vigente a partir de janeiro de 2017 (BRASIL, 2017), quatro (1,8%) das amostras analisadas (n= 212) excedem os limites máximos tolerados para fumonisinas (B1 + B2) livres. Se os resultados fossem avaliados de acordo com os limites estabelecidos pela Comunidade Europeia (CE, 2006a) para o somatório de fumonisinas (B1 + B2) livres, doze (5,6%) amostras estariam acima do limite permitido.

Considerando a contaminação por fumonisinas mascaradas, de acordo com a RDC n° 07/2011, vigente no período de fabricação das amostras, duas (2,3%) das amostras analisadas para fumonisinas totais (n= 87) excederiam o Limite Máximo Tolerável (LMT) de 2500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ estabelecido para produtos à base de milho. De acordo com a RDC n° 138/2017 e a legislação da Comunidade Europeia, cinco (5,7%) e doze (13,8%) amostras excedem os limites máximos estabelecidos, respectivamente (BRASIL, 2017; CE, 2006a).

Figura 22- Cromatogramas demonstrando uma amostra de milho pipoca naturalmente contaminada.



Fonte: (Do autor, 2017).

6 CONCLUSÕES

Nesse estudo a ocorrência de fumonisinas livres e mascaradas foi avaliada em amostras de milho pipoca e produtos à base de milho. Métodos analíticos para determinação de fumonisinas livres e fumonisinas totais (após hidrólise) por CLUE-EM/EM foram desenvolvidos e validados.

Os métodos selecionados para a determinação de fumonisinas livres e totais foram otimizados com o objetivo de reduzir o tempo de análise, bem como adequar às condições analíticas do laboratório.

A influência do procedimento de homogeneização, bem como a menor massa de amostra representativa que poderia ser usada no método de extração das micotoxinas, também foram avaliadas.

Os métodos analíticos desenvolvidos foram aplicados com sucesso nas análises de fumonisinas livres e totais em milho pipoca, flocos de milho, fubá, canjiquinha, farinha de milho torrada, canjica branca e curau de milho.

As fumonisinas livres (B1 + B2) foram encontradas em 100% das amostras analisadas. Dentre os alimentos analisados, o fubá apresentou maior nível de contaminação com concentrações de 39,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 2158,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório das fumonisinas (B1 + B2), entretanto os níveis encontrados não excederam o LMT de acordo com a RDC n° 07/2011, que é de 2500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para produtos à base de milho.

As fumonisinas ligadas/mascaradas foram encontradas em todas as amostras analisadas pelo método de fumonisinas totais. Diferentemente dos resultados encontrados em estudos reportados anteriormente, a maior contribuição de fumonisinas mascaradas foi encontrada em milho pipoca e fubá (produtos não processados termicamente), um novo dado para futuras pesquisas sobre a formação, ocorrência e comportamento químico de fumonisinas mascaradas em milho e nos diferentes produtos à base de milho.

Considerando a importância do milho na alimentação brasileira, bem como, o cereal com maior número de produtos industrializados, é importante o contínuo monitoramento de fumonisinas e fumonisinas mascaradas em milho e derivados.

Os resultados encontrados servem de subsídio para discussão de futuras regulamentações de fumonisinas. Considerando a possível conversão de

micotoxinas mascaradas, demonstrada em estudos *in vivo* e *in vitro* na digestão de alimentos, se apenas as fumonisinas livres forem consideradas, o risco de exposição à essas substâncias pode estar sendo subestimado.

REFERÊNCIAS

- ADEYEYE, S.A.O. Fungal mycotoxins in foods: a review. **Cogent Food and Agriculture**, v. 2, 2016.
- AMARAL, R. C.; BERNARDES, T. F. **Conhecendo e escolhendo híbridos de milho para silagem**. 2012. Disponível em: <<http://m.milkpoint.com.br/radar-tecnico/conservacao-de-forragens/conhecendo-e-escolhendo-hibridos-de-milho-para-silagem-80791n.aspx>>. Acesso em: 22 nov. 2017.
- ANDRADE, P. D. **Micotoxinas em cereais e seus produtos**: desenvolvimento de método analítico e avaliação do risco da exposição na dieta. Brasília: Universidade de Brasília. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, 2016.
- AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. **Árvore do conhecimento**: flocos de milho. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fdyq37cx02wx5a900e1ge5ellzkg4.html>>. Acesso em: 24 nov. 2017.
- ALESSI, M. O.; RAUPP, D. S.; GARDINGO, J. R. Caracterização do Processamento da Farinha de Milho Biju para o Aproveitamento dos Subprodutos. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 31-39, 2003.
- ALIZADEH, A. et al. Deoxynivalenol and Its Modified Forms: Are There Major Differences? **Toxins**, v. 8, n. 334, 2016.
- ATANDA S. A. et al. Fungi and mycotoxins in stored foods. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 25, p. 4373-4382, 2011.
- BARTÓK, T. et al. Detection of Previously Unknown Fumonisin P Analogue Mycotoxins in a *Fusarium verticillioides* Culture by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Time-of-Flight and Ion Trap Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 52, p. 508-513, 2014.
- BAZILIO, F. S. et al. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva de calibração ao modelo linear. **Analytica**, 2011.
- BELOGLAZOVA, N. V. et al. Immunochemical approach for zearalenone-4-glucoside determination. **Talanta**, v. 106, p. 422-430, 2013.

BELSLEY, D. A.; KUH, E.; WELSCH, R. E. **Regression diagnostics**: identifying influential data and sources of collinearity. New York: Wiley, p. 292, 1980.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BERTHILLER, F. et al. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3421-5, 2005.

BERTHILLER, F. et al. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. **International Journal of Food Microbiology**, 119, 33-37, 2007.

BERTHILLER, F. et al. Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p.1243-1252, 2009.

BERTHILLER, F. et al. Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. **Toxicology Letters**, v. 206, n. 3, p. 264-267, 2011.

BERTHILLER, F. et al. Masked mycotoxins: A review. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, p. 165-186, 2013.

BERTHILLER, F.; MARAGOS, C. M.; DALL'ASTA, C. Introduction to Masked Mycotoxins. **Issues in Toxicology**, n. 24, 2016.

BERTUZZI, T. et al. Hidden Fumonisin: simple and Innovative Extractions for Their Determination in Maize and Derived Products. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 1970-1979, 2016.

BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure Elucidation of the Fumonisin, Mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, 1988.

BINDER, S. B. et al. Metabolism of Zearalenone and Its Major Modified Forms in Pigs. **Toxins**, v. 9, n. 56, 2017.

BITTENCOURT, A. B. F. et al. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 16, p. 117-120, 2005.

BITTNER, A. et al. Matrix Binding of Ochratoxin A during Roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 12737-12743, 2013.

BORDIN, K. et al. Assessment of dietary intake of fumonisin B1 in São Paulo, Brazil. **Food Chemistry**, v. 155, p. 174-178, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução-CNNPA nº 12 de 1978. A Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, em conformidade como artigo nº 64, do Decreto-lei nº 986, de 21 de outubro de 1969 e de acordo com o que foi estabelecido na 410ª. Sessão Plenária, realizada em 30/03/78, resolve aprovar as seguintes NORMAS TÉCNICAS ESPECIAIS, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 24 jul. 1978.

_____. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 22 de fev. 2011.

_____. Resolução RDC nº 138, de 8 de fevereiro de 2017. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada- RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 9 de fevereiro de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n. 183, art 1. Adotar regulamento técnico do MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela resolução nº 56/94 do grupo Mercado comum do Sul de 1 de janeiro de 1995. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 mar. 1996.

_____. Portaria nº 130, 24 de maio de 2006. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento institui o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 mai. Seção 2, p. 5. 2006.

BRERA, C. et al. Effect of industrial processing on the distribution of fumonisin b1 in dry milling corn fractions. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1261-1266, 2004.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatographic B**, v. 686, p. 3-10, 1996.

BRETZ, M. et al. Thermal degradation of the fusarium mycotoxin deoxynivalenol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6445-6451, 2006.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRODEHL, A. et al. Biotransformation of the mycotoxin zearalenone by fungi of the genera *Rhizopus* and *Aspergillus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 359, p. 124-130, 2014.

BROEKAERT, N. et al. Oral Bioavailability, Hydrolysis, and Comparative Toxicokinetics of 3-Acetyldeoxynivalenol and 15-Acetyldeoxynivalenol in Broiler Chickens and Pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 39, p. 8734-8742, 2015.

BROEKAERT, N. et al. In vivo contribution of deoxynivalenol-3- β -d-glucoside to deoxynivalenol exposure in broiler chickens and pigs: oral bioavailability, hydrolysis and toxicokinetics. **Archives of Toxicology**, v. 91, p. 699-712, 2017.

BROGI, L. E. et al. Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 5, p. 465-469, 2002.

BROWN, B.M. & FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, p. 364-367, 1974.

BRYLA, M. et al. Effect of baking on reduction of free and hidden fumonisins in gluten-free bread. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 62, p. 10341-47, 2014.

BRYLA, M. et al. Fumonisins and their masked forms in maize products. **Food Control**, v. 59, p. 619-627, 2016.

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

BUSMAN, M; POLING, S. M.; MARAGOS, C. M. Observation of T-2 Toxin and HT-2 Toxin Glucosides from *Fusarium sporotrichioides* by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). **Toxins**, v. 3, p. 1554-1568, 2011.

CALDAS, E. D.; SILVA, A. C. Mycotoxins in Corn-Based Food Products Consumed in Brazil: An Exposure Assessment for Fumonisin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7974-80, 2007.

CARDOSO, W., et al. Indústria do milho. In: BORÉM, A.; RIOS, S. de A. (Ed.). **Milho biofortificado**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. p. 173-195. Cap. 8.

CARVALHO, R. V. **Formulações de snacks de terceira geração por extrusão**: caracterização texturométrica e microestrutural. 89 f. Dissertação (Mestrado em m Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, 2000.

CARVALHO, A. V. et al. Processamento e caracterização de snack extrudado a partir de farinhas de quirera de arroz e de bandinha de feijão. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 72-83, 2012.

CARRASCO, Y. R. et al. A survey of trichothecenes, zearalenone and patulin in milled grain-based products using GC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 146, p. 212-219, 2014.

CARRASCO, Y. R. et al. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. **Food Chemistry**, v. 178, p. 149-155, 2015.

CASTELO, M. M. et al. Extrusion Cooking Reduces Recoverability of Fumonisin B1 from Extruded Corn Grits. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 44, 1998.

CASTELO, M. M., SUMNER, S. S, BULLERMAN, L. B. Stability of fumonisins in thermally processed corn products. **Journal of Food Protection**, August, v. 61, n. 8, p. 1030-3, 1998.

COLEMAN, J. O. D. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 144-151, 1997.

COMUNIDADE EUROPEIA. 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 the European Communities**, Brussels, 2002.

_____. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Commission Regulation (EC) No 1881/2006. **Official Journal of the European Union**, 2006a.

_____. Commission Regulation (EC) N° 401/2006 - laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 2006b.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perspectivas para a agropecuária**: safra 2017/2018. Brasília, v. 5, p. 1-111, 2017.

CHILAKA, C. A. et al. Occurrence of *Fusarium* Mycotoxins in Cereal Crops and Processed Products (*Ogi*) from Nigeria. **Toxins**, v. 8, n. 342, 2016.

CIGIC, I. K.; PROSEN, H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 62-115, 2009.

CIRLINI, M.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G. Hyphenated chromatographic techniques for structural characterization and determination of masked mycotoxins. **Journal of Chromatography A**, v. 1255, p. 145-52, 2012.

CIRLINI, M. et al. Hydrolysed fumonisin B1 and N-(deoxy-D-fructos-1-yl)- fumonisin B1: stability and catabolic fate under simulated human gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, p. 98-103, 2014.

CIRLINI, M. et al. Study on the uptake and deglycosylation of the masked forms of zearalenone in human intestinal Caco-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 98, p. 232-239, 2016.

DALL'ASTA, C. et al. A LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in maize and maize-based products. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 3, p. 237-246, 2008.

DALL'ASTA, C. et al. Free and bound fumonisins in gluten-free food products. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, p. 492-499, 2009(a).

DALL'ASTA, C. et al. Difficulties in fumonisin determination: the issue of hidden fumonisins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p.1335-1345, 2009(b).

DALL'ASTA, C. et al. *In Vitro* Digestion Assay for Determination of Hidden Fumonisins in Maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12042-12047, 2010.

DALL'ERTA, A. et al. Masked Mycotoxins Are Efficiently Hydrolyzed by Human Colonic Microbiota Releasing Their Aglycones. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, p. 305-312, 2013.

DE BROEVE, M. et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2- toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, n. 5, p. 819-835, 2012.

DE BROEVE, M. et al. Human exposure to mycotoxins and their masked forms through cereal- based foods in Belgium. **Toxicology Letters**, v. 218, p. 281-292, 2013.

DE BOEVRE, M.; GRANICZKOWSKA, K.; SAEGER, S. Metabolism of modified mycotoxins studied through in vitro and in vivo models: An overview. **Toxicology Letters**, v. 233, p. 24-28, 2015.

DELLAFIORA, L.; DALL'ASTA, C. Masked mycotoxins: An emerging issue that makes renegotiable what is ordinary. **Food Chemistry**, v. 213, p. 534-535, 2016.

DELLAFIORA, L. et al. Assessing the hydrolytic fate of the masked mycotoxin zearalenone-14-glucoside- A warning light for the need to look at the "maskedome". **Food and Chemical Toxicology**, v. 99, p. 9-16, 2017.

DILKIN, P. et al. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1345-1353, 2003.

DOKO, M. B. et al. Natural Co-occurrence of Fumonisin and Zearalenone in Cereals and Cereal-Based Foods from Eastern and Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3240-3243, 1996.

DRAPER N. & SMITH, H. Applied regression analysis. **New York: Wiley**, 706 p., 1998.

DURBIN J. & WATSON, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. **Biometrika**, v. 38, n. 1-2, p. 159-178, 1951.

DUTTON, M. F. The African Fusarium/maize disease. **Mycotoxin Research**, v. 25, p. 29-39, 2009.

EDIAGE, E. N. et al. A Validated Multianalyte LC-MS/MS Method for Quantification OF 25 Mycotoxins in Cassava Flour, Peanut Cake and Maize Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5173-5180, 2011.

EL-SHARKAWY, S. H. et al. Microbial Transformation of Zearalenone to a Zearalenone Sulfate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 549-552, 1991.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Embrapa milho e sorgo**: sistema de produção - 1 versão eletrônica. 7. ed., 2011. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 10 out. 2012.

_____. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Prevalência de Espécies de Fusarium Produtoras de Fumonisin Associadas a Grãos de Milho no Brasil. **Embrapa Milho e Sorgo**. 21. ed. Sete Lagoas, MG, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1012073/prevalencia-de-especies-de-fusarium-produtoras-de-fumonisin-associadas-a-graos-de-milho-no-brasil>>. Acesso em: 29 out. 2017.

ENGELHARDT, G. et al. Metabolism of mycotoxins in plants. **Advances in Food Sciences**, v. 21, p. 71-78, 1999.

FALAVIGNA, C. et al. Masked fumonisins in processed food: co-occurrence of hidden and bound forms and their stability under digestive conditions. **World Mycotoxin Journal**, v. 5, n. 3, 2012.

FALAVIGNA, C. et al. Fatty acid esters of fumonisins: first evidence of their presence in maize. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 30, n. 9, p. 1606-1613, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Distribution of the report of the eighth session of the Codex Committee on Contaminants in Foods (REP14/CF)**. Geneva, Switzerland, 2014. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/download/report/906/REP14_CFe.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. **FAO Food and Nutrition Paper**, Rome, Italy, n. 81, 2004.

FERNÁNDEZ-SURUMAY, G. et al. Glucose Reaction with Fumonisin B1 Partially Reduces Its Toxicity in Swine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 7732-7739, 2004.

GALAVERNA, G. et al. Masked Mycotoxins: an Emerging Issue for Food Safety. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, 2009.

GARCÍA-CAMPAÑA, A. et al. Chemometric protocol to validate an analytical method in the presence of corrigible constant and proportional systematic errors. **Journal of AOAC International**, v. 80, p. 657-664, 1997.

GARCIA, J. C.; DUARTE, J. O. **Produção e consumo do milho**. Cap. 2. Disponível em: <<https://www.ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48026/1/Producao-consumo.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2017.

GAREIS, M. et al. Cleavage of Zearalenone- Glycoside, a “Masked” Mycotoxin, during Digestion in Swine. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 3, p. 236-40, 1990.

GEARY, P. A. et al. Determination of multi-mycotoxin occurrence in maize based porridges from selected regions of Tanzania by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), a longitudinal study. **Food Control**, v. 68, p. 337-343, 2016.

GELDERBLUM, W. C. A. et al. Novel Mycotoxins with Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, 1988.

GELDERBLOM, W. C. A. et al. Structure-Activity Relationships of Fumonisin in Short-Term Carcinogenesis and Cytotoxicity Assays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 31, n. 6, p. 407-414, 1993.

GELDERBLOM, W. C. A. et al. Fumonisin-Induced Hepatocarcinogenesis: Mechanisms Related to Cancer Initiation and Promotion. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, 2001.

GORST- ALLMAN, C. P.; STEYN, P. S.; VLEGGAR, R. Structure Elucidation of a Novel Trichothecene Glycoside using ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, p. 1553-1555, 1985.

GRATZ, S. W. et al. Masked trichothecene and zearalenone mycotoxins with stand digestion and absorption in the upper GI tract but are efficiently hydrolyzed by human gut microbiota in vitro. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 4, 2017.

HAHN, I. et al. Effects of orally administered fumonisin B1 (FB1), partially hydrolysed FB1, hydrolysed FB1 and *N*-(1-deoxy-D-fructos-1-yl) FB1 on the sphingolipid metabolism in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 76, p. 11-18, 2015.

HERMANN, G. et al. Fungos e Fumonisinas no Período Pré-colheita do Milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 7-10, jan./mar., 2006.

HOWARD, P. C. et al. Formation of *N*-(Carboxymethyl) fumonisin B1, Following the Reaction of Fumonisin B1 with Reducing Sugars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3546-3557, 1998.

HUMPF, H. U.; VOSS, K. A. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 48, p. 255-269, 2004.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 7, p. 138-61, 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs on

the evaluation of carcinogenic risks to humans. **IARC Monographs**, v. 82, p. 301-366, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.145**: protocolo de validação de métodos de análise para micotoxinas em alimentos. Rev. 03. Rio de Janeiro, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**: DOQ-CGCRE-08, Rev. 06, 2017.

JACKSON, L. S. et al. Effects of Baking and Frying on the Fumonisin B1 Content of Corn-Based Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4800-4805, 1997.

KAMIMURA, H. Conversion of Zearalenone to Zearalenone Glicoside by *Rhizopus* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 515-519, 1986.

KATTA, S. K. et al. Distribution of *Fusarium* Molds and Fumonisin in Dry-Milled Corn Fractions. **Cereal Chemists**, v. 64, n. 6, p. 858-863, 1997.

KHARANDI, N. et al. A novel method for determination of patulin in apple juices by GC-MS. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1619-1623, 2013.

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

KELLERMAN, T. S. et al. Leukoencephalomalacia In Two Horses Induced By Oral Dosing of Fumonisin B1. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 269-275, 1990.

KIM, E. K.; SCOTT, P. M.; LAU, B. P. Y. Hidden fumonisina in corn flakes. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 2, p. 161-169, 2003.

KLUGER, B. et al. Stable isotopic labelling-assisted untargeted metabolic profiling reveals novel conjugates of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 5031-5036, 2013.

KLUGER, B. et al. Biotransformation of the Mycotoxin Deoxynivalenol in Fusarium Resistant and Susceptible Near Isogenic Wheat Lines. **Plos One**, 2015.

KOPPEN, R. et al. Applied Microbiology and Biotechnology Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1595-612, 2010.

KOSTELANSKÁ, M. et al. Determination of mycotoxins in infant and baby food using UPLC-MS/MS analytical method. **Proceedings of 6 th ISC Modern Analytical Chemistry**, Prague, 2010.

KOWALSKA, A.; HAJOK, I.; PIEKUT, A. Assessment of the Contamination Level by Fumonisin B1 and B2 of the Corn Food Products Available on Polish Consumer Market. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 6, p. 2595-2601, 2017.

KRSKA, R. et al. Mycotoxin analysis: an update. **Food Additives and contaminants: Part A**, v. 25, n. 2, p. 152-163, 2008.

KUSHIRO, M. Effects of Milling and Cooking Processes on the Deoxynivalenol Content in Wheat. **International Journal of Molecular Science**, v. 9, p. 2127-2145, 2008.

LATTANZIO, V. M. T. et al. Identification and characterization of new Fusarium masked mycotoxins, T2 and HT2 glycosyl derivatives, in naturally contaminated wheat and oats by liquid chromatography- high-resolution mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, p. 466- 475, 2012.

LATTANZIO, V. M. T. et al. Improved method for the simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in cereals and derived products by liquid chromatography- tandem mass spectrometry after multi-toxin immunoaffinity clean up. **Journal of Chromatography A**, v. 1354, p. 139-143, 2014.

LAZZARO, I. et al. Cornmeal and starch influence the dynamic of fumonisin B, A and C production and masking in *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 21-27, 2013.

LI, C. et al. Rapid Determination of Fumonisin B1 and B2 in Corn by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Ultrasonic Extraction. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, p. 57-63, 2012.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Metodologias Analíticas para Determinação das Fumonisinas em Milho e Alimentos à Base de Milho. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 293-299, 2006.

LINO, C. M. et al. Determination of fumonisins B1 and B2 in Portuguese maize and maize-based samples by HPLC with fluorescence detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 1214-1220, 2006.

LIU, Y. et al. Solvolysis Procedures for the Determination of Bound Residues of the Mycotoxin Deoxynivalenol in Fusarium Species Infected Grain of Two Winter Wheat Cultivars Preinfected with Barley Yellow Dwarf Virus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6864-6869, 2005.

LO MAGRO, S. et al. Assessment of Fumonisins B1 and B2 Levels in Commercial Maize-Based Food Products by Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection and Post column Chemical Derivatization. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, 2011.

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

MAGAN, N.; OLSEN, M. Mycotoxins in food. Detection and control. **Woodhead publishing limited**, p. 471, 2004.

MALACHOVÁ, A. et al. Analytical Strategies for the Determination of Deoxynivalenol and its Modified Forms in Beer: A Mini Review. **Kvasny Prumysl**, v. 61, p. 46-50, 2015(a).

MALACHOVÁ, A. et al. Critical evaluation of indirect methods for the determination of deoxynivalenol and its conjugated forms in cereals. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 6009-6020, 2015(b).

MANGIA, M. **Free and Hidden Fumonisins in Maize and gluten-free products**. 2009. 171 p. (Ph.D. dissertation). Department of Food Science and Technology: Università degli Studi di Parma, 2009.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-37, 2013.

MARQUES, O. J. et al. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. **Acta Scientiarum**. Agronomy, Maringá, v. 31, n. 4, p. 667-75, 2009.

MARTINS, F. A. et al. Daily intake estimates of fumonisins in corn-based food products in the population of Parana, Brazil. **Food Control**, v. 26, p. 614-618, 2012.

MARTINS, H. M. et al. Fumonisins and deoxynivalenol in corn-based food products in Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2585-87, 2008.

MASARAS, W. F. O. Discovery and Occurrence of the Fumonisins: A Historical Perspective. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, 2001.

MATSUO, Y. et al. Detection of *N*-(1- deoxy- D- fructos-1-yl) Fumonisins B2 and B3 in Corn by High- Resolution LC- Orbitrap MS. **Toxins**, v. 7, p. 3700- 3714, 2015.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

MECA, G. et al. Formation of Fumonisin B1-Glucose Reaction Product, in Vitro Cytotoxicity, and Lipid Peroxidation on Kidney Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1359-1365, 2010.

MERRIL, A. H. Sphingolipid Metabolism: Roles in Signal Transduction and Disruption by Fumonisins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, 2001.

METZLER, M. Proposal for a uniform designation of zearalenone and its metabolites. **Mycotoxin Research**, v. 27, p. 1-3, 2011.

MILLER, J. D.; YOUNG, J. C. Fusarium toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxin. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, 1983.

MOL, H. G. et al. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 9450-9, 2008.

MOTTA, E. L.; SCOTT, P. M. Effect of *in vitro* digestion on fumonisin B1 in corn flakes. **Mycotoxin Research**, v. 23, n. 4, p. 166-172, 2007.

_____. Bioaccessibility of total bound fumonisin from corn flakes. **Mycotoxin Research**, v. 25, p. 229-232, 2009.

NAGL, V. et al. Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in rats. **Toxicology Letters**, v. 213, p. 367-373, 2012.

NAGL, V. et al. Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in pigs. **Toxicology Letters**, v. 229, p. 190-197, 2014.

NAKAGAWA, H. et al. Detection of a new Fusarium masked mycotoxin in wheat grain by high-resolution LC-Orbitrap TM MS. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 10, p.1447-1456, 2011.

NAKAGAWA, H. et al. Detection of masked mycotoxins derived from type A trichothecenes in corn by high-resolution LC-Orbitrap mass spectrometer. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 30, n. 8, p. 1407-1414, 2013(a).

NAKAGAWA, H. et al. Detection of Type A Trichothecene Di-Glucosides Produced in Corn by High-Resolution Liquid Chromatography-Orbitrap Mass Spectrometry. **Toxins**, v. 5, p. 590- 604, 2013(b).

NATHANAIL, A. V. et al. Simultaneous determination of major type A and B trichothecenes, zearalenone and certain modified metabolites in Finnish cereal grains with a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 4745-4755, 2015.

NEIRA, M. S. The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 21- 25, 1997.

NEME, K.; MOHAMMED, A. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. **Food Control**, v. 28, p. 412-425, 2017.

NGFA. National Grain and Feed Association. FDA Regulatory Guidance for Mycotoxins – A Guide for Grain Elevators, Feed Manufacturers, Grain Processors and Exporters: National Grain and Feed Association, 2011.

NORRED, W. P. Instability of N-acetylated fumonisin B1 (FA1) and the impact on inhibition of ceramide synthase in rat liver slices. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 1071-1078, 2001.

OLIVEIRA, M. S. et al. Free and hidden fumonisins in Brazilian raw maize samples. **Food Control**, v. 53, p. 217- 221, 2015.

OLIVEIRA, M. S. et al. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. **Food Control**, v. 73, p. 127-132, 2017.

OMURTAG, G. Z. et al. Determination of Fumonisin B1 and B2 in Corn and Corn-Based Products in Turkey by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1072-1075, 2001.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Embrapa Milho e Sorgo, Circular Técnica 75. Sete Lagoas, 2006.

PARIS, M. P. K. et al. Zearalenone-16-O-glucoside: a new masked mycotoxin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 1181-1189, 2014.

PARK, J. W. et al. Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 12, p. 1168-78, 2004.

PERAICA, M. et al. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 9, p. 754-766, 1999.

PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ciências Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 4, 2011.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related food stuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 36, p. 96-136, 2014.

PIETRI, A.; ZANETTI, M.; BERTUZZI, T. Distribution of aflatoxins and fumonisins in dry-milled maize fractions. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 3, p. 372-380, 2009.

PLATTNER, R. D. HPLC/MS analysis of fusarium mycotoxins, fumonisins and deoxynivalenol. **Journal of Natural Toxins**, v. 7, p. 365-370, 1999.

POLING, S. M.; PLATTNER, R. D.; WEISLEDER, D. *N*-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl) Fumonisin B1, the Initial Reaction Product of Fumonisin B1 and D-Glucose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1318-24, 2002.

QUEIROZ, V.A.V. et al. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 83-86, 2012.

REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F.; CASTELLUCCI, A. C. L.; Processamento e industrialização do milho para alimentação humana. **Visão Agrícola**, n. 13, p.138-140, jul/dez, 2015.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2101-2105, 2002.

RIBANI, M. et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RUHLAND, M. et al. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants: 1. Isolation and identification of metabolites formed in cell suspension cultures of wheat and maize. **Journal of Natural Toxins**, v. 4, n. 6, p. 254-60, 1996(a).

RUHLAND, M. et al. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants: 2. Time course and rates of degradation and metabolite production in cell-suspension cultures of different crop plants. **Mycopathologia**, v. 134, n. 2, p. 97- 102, 1996(b).

RUHLAND, M. et al. Transformation of mycotoxin ochratoxin A in artificially contaminated vegetables and cereals. **Mycotoxin Research**. vol. 13, 1997.

RYAN, T. A. & JOINER, B. L. Normal probability plots and tests for normality. **The State College: Pennsylvania State University**, 1976.

SAEGER, S. Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed. Woodhead Publishing Series in Food Science. **Technology and Nutrition: Number 203**. Published by Wood head Publishing Limited, Cambridge, UK, 2011.

SANCHO, G. C. et al. Occurrence of fumonisins in Catalonia (Spain) and an exposure assessment of specific population groups. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, n. 5, p. 799-808, 2012.

SARMENTO, S. B. S. Tecnologia de Produtos Amiláceos. Milho e Mandioca. Lan 2444- Pós-Colheita e Processamento de Alimentos Vegetais. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição. Piracicaba, São Paulo, 2013.

SARTORI, A. V. **Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos analíticos para determinação de micotoxinas em leite, fórmulas infantis, alimentação infantil a base de cereais e amendoim por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial**. 2015. 176 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

SAUNDERS, D. S.; MEREDITH, F. I.; VOSS, K. A. Control of Fumonisin: Effects of Processing. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, 2001.

SAVI, G. D. et al. Fumonisin B1 and B2 in the corn-milling process and corn-based products, and evaluation of estimated daily intake. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 33, n. 2, p. 339-45, 2016.

SCAFF, R. M. C.; SCUSSEL, V. M. Fumonisin B1 and B2 in Corn-Based Products Commercialized in the State of Santa Catarina-Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 911-919, 2004.

SCHMEITZL, C. et al. The Metabolic Fate of Deoxynivalenol and Its Acetylated Derivatives in a Wheat Suspension Culture: Identification and Detection of DON-15-O-Glucoside, 15-Acetyl-DON-3-O-Glucoside and 15-Acetyl-DON-3-Sulfate. **Toxins**, v. 7, p. 3112-3126, 2015.

SCOTT, P. M. et al. Decline in Deoxynivalenol (Vomitoxin) Concentrations in 1983 Ontario Winter Wheat Before Harvest. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 884-886, 1984.

SCOTT, P. M. et al. Studies on extraction of fumonisins from rice, corn-based foods and beans. **Mycotoxin Research**, v. 15, 1999.

SEEFELDER, W. Bound Fumonisin B1: Analysis of Fumonisin-B1 Glyco and Amino Acid Conjugates by Liquid Chromatography- Electrospray Ionization- Tandem Mass

Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5567-5573, 2003.

SILVA, L. J. G. et al. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in Portuguese maize and maize-based foods intended for human consumption. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 4, p. 381-390, 2007.

SIMSEK, S. et al. Analysis of Deoxynivalenol and Deoxynivalenol- 3- glucoside in wheat. **Food Control**, v. 26, p. 287-292, 2012.

SEWALD, N. et al. Structure Elucidation of a Plant Metabolite of 4-desoxynivalenol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 3, n. 7, p. 953-960, 1992.

SOUZA, S.V.C. & JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.

STEFANELLO, J. et al. Incidência de fungos em grãos de milho em função de diferentes épocas de aplicação foliar de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 4, p. 476-81, out./dez., 2012.

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

SYDENHAM, E. W. et al. Potential of Alkaline Hydrolysis for the Removal of Fumonisins from Contaminated Corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1198-1201, 1995.

TAMURA, M. et al. **High Throughput Quantitative Analysis of Multi-mycotoxin in Beer-based Drinks using UHPLCMS/MS**. Shimadzu corporation, sep. 2012.

TOLOSA, J. et al. Multi-Mycotoxin Analysis in Durum Wheat Pasta by Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry. **Toxins**, v. 9, n. 59, 2017.

TRAN, S. T.; SMITH, T.K. Determination of optimal conditions for hydrolysis of conjugated deoxynivalenol in corn and wheat with trifluoromethanesulfonic acid. **Animal Feed Science and Technology**, v. 163, p. 84-92, 2011.

TRAN, S. T.; SMITH, T. K.; GIRGIS, G. N. A survey of free and conjugated deoxynivalenol in the 2008 corn crop in Ontario, Canada. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 37-41, 2011.

TSURUTA, O. Mycotoxin Production on Contaminated Maize by Several Fungal Species. **Report of National Food Research Institute**, v. 32, p. 21-24, 1977.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 2, p. 168-18, 2009.

VARGAS, E. A. et al. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisina B1 in Brazilian corn. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 11, p. 981-986, 2001.

VENDL, O. et al. Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cereal-based food by LC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 5, p. 1347-54, 2009.

VENDL, O. et al. Occurrence of free and conjugated Fusarium mycotoxins in cereal-based food. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 8, p. 1148-1152, 2010.

VERSILOVSKIS, A. et al. Simultaneous determination of masked forms of deoxynivalenol and zearalenone after oral dosing in rats by LC-MS/MS. **World Mycotoxin Journal**, v. 5, p. 303-318, 2012.

VOSS, K. A.; SMITH, G. W.; HASCHEK, W. M. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 299-325, 2007.

YIBADATIHAN, S. et al. Simultaneous determination of multi-mycotoxins in palm kernel cake (PKC) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Food Additives and Contaminants Part A**, v. 31, p. 2071-2079, 2014.

WANG, X.; LI, P. Rapid screening of mycotoxins in liquid milk and milk powder by automated size-exclusion SPE-UPLC-MS/MS and quantification of matrix effects over the whole chromatographic run. **Food Chemistry**, v. 173, p. 897-904, 2015.

WARTH, B. et al. Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC-MS/MS based biomarker method. **Toxicology Letters**, v. 211, p. 85-90, 2012.

WARTH, B. et al. New insights into the human metabolism of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. **Toxicology Letters**, v. 220, p. 88-94, 2013.

WARTH, B. et al. Deoxynivalenol-sulfates: identification and quantification of novel conjugated (masked) mycotoxins in wheat. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 1033-1039, 2015.

WHO. World Health Organization. Fumonisin B1 (Environmental Health Criteria 219). **International Programme on Chemical Safety**, Geneva, 2000.

WILSON, T. M.; NELSON, P. E.; KNEPP, C. R. Hepatic neoplastic nodules, adenofibrosis, and cholangiocarcinomas in male Fisher 344 rats fed corn naturally contaminated with *Fusarium moniliforme*. **Carcinogenesis**, v. 6, n. 8, p. 1155-1160, 1985.

WU, F.; GROOPMAN, J. D.; PESTKA, J. J. Public Health Impacts of Foodborne Mycotoxins. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, p. 351-72, 2014.

ZACHARIASOVA, M. et al. Deoxynivalenol Oligoglycosides: New "Masked" Fusarium Toxins Occurring in Malt, Beer, and Breadstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9280-9291, 2012.

ZHOU, B. et al. Doehlert Matrix Design for Optimization of the Determination of Bound Deoxynivalenol in Barley Grain with Trifluoroacetic Acid (TFA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10141-10149, 2007.

APÊNDICE A - Resultados encontrados para as fumonisinas livres nas amostras de milho pipoca e produtos à base de milho ($\mu\text{g}/\text{kg}$) – Rio de Janeiro.

Matriz	Cód. Amostras	FB1	FB2	(FB1+FB2)	HFB1	HFB2
Milho pipoca	99-16	267,5	68,0	335,5	8,9	<LQ
	100-16	93,7	27,1	120,8	<LQ	<LD
	101-16	265,6	91,3	357,0	4,7	<LD
	102-16	146,8	38,8	185,6	5,4	<LD
	103-16	192,4	32,5	224,8	<LQ	<LD
	104-16	244,0	60,3	304,3	9,9	<LQ
	105-16	168,3	40,3	208,6	<LQ	<LD
	106-16	206,4	45,7	252,1	<LD	<LD
	107-16	196,3	48,5	244,9	<LQ	<LD
	108-16	222,3	65,4	287,7	5,2	<LD
	109-16	133,5	32,6	166,1	4,9	<LD
	110-16	59,0	11,7	70,7	<LQ	<LD
	111-16	226,7	59,2	285,9	<LQ	<LD
	112-16	123,5	30,5	154,1	<LD	<LD
	113-16	24,2	3,6	27,8	<LD	<LD
	114-16	241,9	61,3	303,2	6,7	<LQ
	115-16	265,2	47,2	312,4	5,1	<LD
	116-16	67,3	11,6	78,8	<LD	<LD
117-16	183,0	45,6	228,6	<LQ	<LD	
118-16	152,1	34,3	186,4	6,6	4,0	
Flocos de milho	140-16	16,1	3,4	19,5	<LQ	<LD
	141-16	374,4	99,5	473,8	<LQ	<LD
	142-16	286,1	89,0	375,1	4,0	<LD
	143-16	131,8	36,3	168,1	<LQ	<LD
	144-16	59,9	17,1	77,0	<LQ	<LD
	145-16	20,2	4,1	24,2	<LQ	<LD
	146-16	562,2	227,4	789,6	5,8	2,1
	147-16	210,4	57,3	267,7	<LQ	<LD
	148-16	9,4	2,6	12,0	<LQ	<LD
	149-16	250,3	65,4	315,7	<LQ	<LQ
	150-16	263,3	81,1	344,3	<LQ	<LD
	151-16	15,6	4,0	19,6	<LQ	<LD
	152-16	88,5	26,1	114,7	<LQ	<LD
	153-16	108,3	32,1	140,4	<LQ	<LD
	154-16	96,1	27,7	123,8	<LQ	<LD
	155-16	115,6	30,9	146,5	<LQ	<LD

Matriz	Cód. Amostras	FB1	FB2	(FB1+FB2)	HFB1	HFB2
	156-16	156,7	41,0	197,7	<LQ	<LD
	157-16	88,2	22,5	110,7	<LQ	<LQ
	158-16	73,3	19,9	93,2	<LQ	<LD
	159-16	98,3	29,8	128,1	<LQ	<LD
	179-16	31,7	7,5	39,2	<LD	<LD
	180-16	300,9	80,2	381,1	<LD	<LD
	181-16	814,2	211,3	1025,5	<LQ	<LD
	182-16	53,5	15,4	69,0	<LQ	<LD
	183-16	296,6	77,7	374,3	<LD	<LD
	184-16	108,8	29,8	138,6	<LQ	<LD
	185-16	72,8	22,4	95,2	<LQ	<LD
	186-16	287,6	71,3	358,8	<LD	<LD
	187-16	847,1	202,8	1049,8	<LD	<LD
	188-16	184,8	54,2	239,1	<LD	<LD
Fubá	189-16	847,5	227,2	1074,7	<LQ	<LD
	190-16	1544,6	436,0	1980,6	5,3	<LD
	191-16	222,8	62,2	285,1	<LQ	<LD
	192-16	106,9	31,3	138,1	<LQ	<LD
	193-16	366,9	100,2	467,1	<LQ	<LD
	194-16	368,5	94,4	463,0	<LQ	<LD
	195-16	712,5	184,2	896,7	<LQ	<LD
	196-16	549,5	143,3	692,8	<LQ	<LD
	197-16	1076,4	310,9	1387,3	<LQ	<LD
	198-16	144,8	41,9	186,7	<LD	<LD
	202-16	109,5	45,4	154,9	<LQ	<LQ
	203-16	46,5	16,0	62,6	<LD	<LD
	204-16	48,2	16,6	64,8	<LD	<LD
Farinha de milho	205-16	455,1	152,3	607,4	<LD	<LD
	206-16	46,4	14,6	61,0	<LD	<LD
	207-16	212,0	83,8	295,8	<LQ	<LD
	208-16	55,0	11,8	66,8	<LD	<LD
	209-16	61,3	14,5	75,7	<LD	<LD
	210-16	123,8	36,6	160,3	<LQ	<LD
Canjica branca	211-16	29,2	7,1	36,3	<LD	<LD
	212-16	65,7	15,1	80,8	<LD	<LD
	213-16	5,0	<LQ	7,2	<LD	<LD
	214-16	110,8	27,5	138,3	<LD	<LD
	215-16	11,1	3,0	14,1	<LD	<LD

Matriz	Cód. Amostras	FB1	FB2	(FB1+FB2)	HFB1	HFB2
	216-16	28,4	6,3	34,8	<LD	<LD
	217-16	29,1	8,3	37,4	<LD	<LD
	218-16	26,4	5,7	32,1	<LD	<LD
	219-16	263,5	72,0	335,4	<LD	<LD
	220-16	364,5	101,4	465,9	<LD	<LD
	221-16	92,7	23,6	116,2	<LD	<LD
Canjiquinha	222-16	39,8	9,5	49,3	<LD	<LD
	223-16	125,8	34,5	160,3	<LD	<LD
	224-16	71,0	17,4	88,4	<LD	<LD
	225-16	74,4	12,8	87,3	<LD	<LD
	226-16	252,4	67,3	319,7	<LD	<LD
	227-16	360,7	79,9	440,6	<LD	<LD

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2.

APÊNDICE B - Resultados encontrados para as fumonisinas livres nas amostras de milho pipoca e produtos à base de milho ($\mu\text{g}/\text{kg}$) – PROMAC.

Matriz	Cód. Amostras	FB1	FB2	(FB1+FB2)	HFB1	HFB2
Milho pipoca	128-16	10,7	4,4	15,1	<LD	<LD
	129-16	97,5	19,4	116,9	8,1	<LD
	130-16	67,9	15,0	82,9	<LD	<LD
	131-16	170,5	49,8	220,3	<LD	<LD
	132-16	166,4	44,5	210,9	<LD	<LD
	19-17	210,7	61,1	271,8	10,6	>LD
	20-17	184,5	36,2	220,7	>LD	<LD
	21-17	35,6	9,0	44,7	<LD	<LD
	228-16	25,6	8,5	34,1	<LD	<LD
	229-16	73,3	21,6	94,9	<LD	<LD
	22-17	202,9	44,7	247,6	>LD	<LD
	230-16	120,7	26,5	147,2	>LD	<LD
	231-16	139,9	35,1	175,0	4,6	<LD
	232-16	182,0	42,2	224,2	>LD	<LD
	233-16	162,9	34,0	196,8	<LD	<LD
	234-16	69,3	15,2	84,5	<LD	<LD
	235-16	361,1	98,5	459,5	8,2	<LD
	236-16	51,6	12,5	64,1	>LD	<LD
	23-17	818,7	273,7	1092,4	>LD	<LD
	262-16	220,8	51,7	272,5	<LD	<LD
	263-16	413,1	132,9	546,0	>LD	<LD
	265-16	251,8	80,6	332,3	>LD	<LD
	267-16	312,4	71,5	383,9	<LD	<LD
	268-16	75,6	20,3	96,0	>LD	<LD
	269-16	298,4	96,7	395,2	>LD	2,4
	270-16	267,1	72,6	339,6	<LD	<LD
	271-16	946,7	300,0	1246,7	>LD	<LD
272-16	239,4	74,3	313,7	>LD	<LD	
273-16	339,7	84,1	423,8	>LD	<LD	
274-16	78,6	16,7	95,3	>LD	<LD	
Flocos de milho	03-17	364,3	89,5	453,7	<LD	<LD
	07-17	114,9	21,3	136,1	<LD	<LD
	08-17	137,8	29,5	167,3	<LD	<LD
	13-17	241,8	69,9	311,6	<LD	<LD
	14-17	333,4	112,0	445,5	>LD	<LD

Matriz	Cód. Amostras	FB1	FB2	(FB1+FB2)	HFB1	HFB2
	163-16	381,8	84,6	466,3	<LD	<LD
	164-16	177,1	42,4	219,5	<LD	<LD
	166-16	55,4	10,8	66,1	<LD	<LD
	167-16	264,8	56,5	321,2	<LD	<LD
	169-16	259,3	81,4	340,7	>LD	<LD
	170-16	373,5	119,2	492,7	>LD	<LD
	237-16	247,8	43,2	291,0	<LD	<LD
	238-16	209,3	45,4	254,8	<LD	<LD
	239-16	632,2	155,3	787,5	<LD	<LD
	245-16	814,0	176,4	990,5	<LD	<LD
	246-16	48,9	9,0	57,9	<LD	<LD
	247-16	120,1	19,2	139,3	<LD	<LD
	248-16	67,6	10,3	77,9	<LD	<LD
	249-16	218,1	46,5	264,6	<LD	<LD
	250-16	109,8	18,5	128,3	<LD	<LD
	284-16	417,8	114,0	531,7	<LD	<LD
	285-16	393,5	110,2	503,7	>LD	<LD
	292-16	110,4	19,2	129,6	<LD	<LD
	293-16	228,5	49,3	277,7	<LD	<LD
	294-16	48,0	8,5	56,5	<LD	<LD
	295-16	207,7	41,9	249,5	<LD	<LD
	296-16	363,5	101,9	465,4	>LD	<LD
	298-16	345,6	85,9	431,5	<LD	<LD
	299-16	98,3	14,9	113,2	<LD	<LD
	10-17	653,4	151,4	804,8	>LD	<LD
	11-17	87,7	18,0	105,6	<LD	<LD
	123-16	495,1	114,9	609,9	8,9	>LD
	124-16	1193,7	243,2	1437,0	<LD	<LD
	125-16	193,2	45,3	238,5	<LD	<LD
	126-16	520,1	104,4	624,4	<LD	<LD
Fubá	127-16	288,0	74,3	362,3	>LD	1,7
	12-17	180,8	38,0	218,8	<LD	<LD
	174-16	1560,5	354,2	1914,7	>LD	<LD
	175-16	409,8	109,9	519,7	>LD	<LD
	176-16	118,9	20,4	139,3	>LD	<LD
	177-16	187,9	52,2	240,1	<LD	<LD
	251-16	782,3	198,1	980,5	5,5	>LD
	252-16	46,0	7,7	53,7	<LD	<LD

Matriz	Cód. Amostras	FB1	FB2	(FB1+FB2)	HFB1	HFB2
	253-16	109,4	23,6	132,9	<LD	<LD
	254-16	390,8	101,2	492,0	<LD	<LD
	255-16	240,5	58,4	298,8	<LD	<LD
	256-16	213,8	46,5	260,3	<LD	<LD
	257-16	490,3	129,5	619,7	>LD	>LD
	258-16	120,5	25,8	146,3	<LD	<LD
	264-16	132,5	27,4	159,9	<LD	<LD
	275-16	416,8	105,3	522,1	>LD	<LD
	276-16	137,1	29,5	166,6	<LD	<LD
	277-16	134,5	26,0	160,5	<LD	<LD
	278-16	323,7	86,7	410,4	4,2	>LD
	279-16	139,3	33,8	173,1	<LD	<LD
	280-16	1727,3	430,9	2158,18	>LD	<LD
	281-16	224,8	48,7	273,6	<LD	<LD
	282-16	80,9	13,5	94,4	<LD	<LD
	283-16	1508,2	375,6	1883,8	>LD	<LD
	01-17	424,2	142,8	567,0	>LD	<LD
	02-17	74,2	27,1	101,4	<LD	<LD
	04-17	226,5	109,2	335,8	<LD	<LD
	05-17	32,7	12,2	44,8	<LD	<LD
	06-17	205,2	99,8	304,9	<LD	<LD
Farinha de milho	09-17	81,6	23,8	105,4	<LD	<LD
	165-16	111,6	50,6	162,2	<LD	<LD
	168-16	30,6	12,0	42,5	<LD	<LD
	261-16	104,9	35,8	140,7	<LD	<LD
	290-16	88,8	29,9	118,7	<LD	<LD
	291-16	63,8	39,1	102,9	>LD	<LD
	297-16	218,0	74,5	292,4	<LD	<LD
	15-17	230,6	55,7	286,3	>LD	<LD
	16-17	79,1	20,9	99,9	<LD	<LD
	171-16	8,2	2,7	10,9	<LD	<LD
	172-16	92,2	28,2	120,4	<LD	<LD
Canjiquinha	17-17	25,4	6,4	31,8	<LD	<LD
	18-17	142,2	40,0	182,2	<LD	<LD
	24-17	19,0	6,8	25,8	<LD	<LD
	259-16	264,3	67,2	331,5	<LD	<LD
	25-17	25,0	7,6	32,6	<LD	<LD
	260-16	75,8	23,2	99,1	<LD	<LD

Matriz	Cód. Amostras	FB1	FB2	(FB1+FB2)	HFB1	HFB2
	28-17	74,2	23,5	97,6	<LD	<LD
	173-16	20,6	6,9	27,5	<LD	<LD
	266-16	10,7	3,1	13,7	<LD	<LD
Canjica branca	26-17	106,3	35,3	141,6	<LD	<LD
	27-17	33,3	9,4	42,8	<LD	<LD
	29-17	58,0	22,9	80,8	<LD	<LD
	240-16	652,5	190,8	843,3	>LD	<LD
	241-16	495,6	125,7	621,3	>LD	<LD
	242-16	24,1	4,8	28,9	<LD	<LD
	243-16	23,0	4,6	27,3	<LD	<LD
Curau de milho	244-16	543,8	153,4	697,2	2,5	<LD
	286-16	17,2	4,8	22,0	<LD	<LD
	287-16	22,2	4,2	26,4	<LD	<LD
	288-16	269,2	76,5	345,8	>LD	<LD
	289-16	18,2	4,2	22,4	<LD	<LD

HFB1: fumonisina B1 hidrolisada; HFB2: fumonisina B2 hidrolisada; FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2.

APÊNDICE C - Resultados para as fumonisinas B1 e B2 mascaradas encontradas nas amostras de milho pipoca e produtos à base de milho ($\mu\text{g}/\text{kg}$) – PROMAC.

Matriz	Cód. Amostras	FB1 mascarada	FB2 mascarada	FB1+FB2 mascarada
Milho pipoca	131-16	143,1	18,0	161,1
	132-16	106,1	3,7	109,8
	19-17	204,6	4,0	208,7
	20-17	271,4	19,0	290,4
	22-17	379,8	47,4	427,3
	230-16	137,8	7,3	145,1
	231-16	158,0	12,6	170,6
	232-16	235,5	19,3	254,9
	233-16	109,9	4,6	114,5
	235-16	238,4	8,8	247,2
	23-17	467,3	34,7	502,0
	262-16	209,8	18,1	227,9
	263-16	278,5	8,3	286,8
	265-16	277,5	25,5	303,0
	267-16	176,6	2,6	179,2
	269-16	317,1	36,7	353,8
	270-16	215,5	17,6	233,2
	271-16	457,0	8,1	465,1
	272-16	193,0	8,8	201,8
	273-16	117,4	0,0	117,4
Flocos de milho	03-17	120,7	4,5	125,2
	07-17	25,3	4,9	30,2
	08-17	49,6	9,8	59,4
	13-17	121,0	18,0	139,0
	14-17	130,8	3,7	134,5
	163-16	158,8	13,6	172,5
	164-16	82,4	9,9	92,3
	167-16	24,8	0,0	24,8
	169-16	123,6	13,9	137,4
	170-16	147,5	16,2	163,7
	237-16	67,1	5,7	72,8
	238-16	62,3	4,7	67,0
	239-16	193,3	14,6	207,9
	245-16	231,6	17,2	248,8
	247-16	26,9	4,9	31,7

Matriz	Cód.	FB1	FB2	FB1+FB2
	Amostras	mascarada	mascarada	mascarada
	249-16	88,4	5,6	94,0
	250-16	34,3	5,5	39,8
	284-16	153,1	12,4	165,5
	285-16	65,8	0,0	65,8
	292-16	41,6	4,9	46,6
	293-16	38,4	6,6	45,1
	295-16	97,9	9,0	106,9
	296-16	156,3	9,7	166,0
	298-16	165,4	23,3	188,6
	10-17	335,7	77,4	413,1
	123-16	400,5	64,5	465,0
	124-16	627,8	123,0	750,8
	125-16	151,0	24,1	175,1
	126-16	269,6	37,7	307,3
	127-16	263,9	45,9	309,8
	12-17	137,0	23,0	160,0
	174-16	411,2	151,2	562,4
	175-16	248,8	45,8	294,6
	176-16	116,0	17,4	133,4
	177-16	162,9	32,4	195,2
	251-16	413,0	96,6	509,7
	253-16	118,8	18,8	137,6
Fubá	254-16	239,6	36,5	276,1
	255-16	210,1	24,2	234,3
	256-16	141,7	22,5	164,2
	257-16	264,6	54,8	319,4
	258-16	129,1	21,5	150,6
	264-16	89,7	14,8	104,5
	275-16	238,3	50,7	289,1
	276-16	104,1	16,7	120,8
	277-16	118,0	18,6	136,6
	278-16	259,5	45,3	304,7
	279-16	116,0	18,4	134,4
	280-16	463,8	190,6	654,4
	281-16	123,1	23,2	146,3
	283-16	509,4	196,4	705,9
Farinha de	261-16	33,8	0,0	33,8
milho	165-16	71,3	6,3	77,6

Matriz	Cód.	FB1	FB2	FB1+FB2
	Amostras	mascarada	mascarada	mascarada
	06-17	103,0	8,8	111,8
	297-16	119,1	11,3	130,4
	04-17	113,5	12,1	125,6
	01-17	222,0	21,7	243,7
Canjiquinha	260-16	39,7	6,6	46,2
	16-17	45,1	7,7	52,8
	172-16	51,4	6,0	57,4
	18-17	17,3	1,9	19,2
	15-17	63,7	5,0	68,7
	259-16	94,3	7,3	101,6
Curau de milho	288-16	132,3	13,7	145,9
	241-16	171,2	2,9	174,2
	244-16	195,5	8,4	203,9
	240-16	296,6	32,2	328,8

FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2.

APÊNDICE D - Resultados para as fumonisinas B1 e B2 totais (após hidrólise das amostras) encontradas nas amostras de milho pipoca e produtos à base de milho ($\mu\text{g}/\text{kg}$) – PROMAC.

Matriz	Cód.	FB1	FB2	FB1+FB2
	Amostras	Total	Total	Totais
Milho Pipoca	131-16	313,6	67,8	381,4
	132-16	272,5	48,2	320,7
	19-17	415,3	65,1	480,5
	20-17	455,9	55,2	511,1
	22-17	582,7	92,1	674,9
	230-16	258,5	33,8	292,3
	231-16	297,9	47,7	345,6
	232-16	417,5	61,5	479,1
	233-16	272,8	38,6	311,4
	235-16	599,5	107,3	706,8
	23-17	1286,0	308,4	1594,4
	262-16	430,6	69,8	500,4
	263-16	691,6	141,2	832,8
	265-16	529,3	106,1	635,4
	267-16	489,0	74,1	563,1
	269-16	615,5	133,4	748,9
	270-16	482,6	90,2	572,9
	271-16	1403,7	308,1	1711,8
	272-16	432,4	83,1	515,5
	273-16	457,1	73,5	530,5
Flocos de milho	03-17	485,0	94,0	579,0
	07-17	140,2	26,2	166,4
	08-17	187,4	39,3	226,7
	13-17	362,8	87,9	450,7
	14-17	464,2	115,7	579,9
	163-16	540,6	98,2	638,9
	164-16	259,5	52,3	311,8
	167-16	289,6	55,0	344,7
	169-16	382,9	95,3	478,1
	170-16	521,0	135,4	656,4
	237-16	314,9	48,9	363,8
	238-16	271,6	50,1	321,7
	239-16	825,5	169,9	995,4

Matriz	Cód.	FB1	FB2	FB1+FB2
	Amostras	Total	Total	Totais
	245-16	1045,6	193,6	1239,2
	247-16	147,0	24,1	171,0
	249-16	306,5	52,1	358,6
	250-16	144,1	24,0	168,1
	284-16	570,9	126,4	697,3
	285-16	459,3	106,5	565,8
	292-16	152,0	24,1	176,2
	293-16	266,9	55,9	322,9
	295-16	305,6	50,9	356,5
	296-16	519,8	111,6	631,4
	298-16	511,0	109,2	620,1
	10-17	989,1	228,8	1217,9
	123-16	895,6	179,4	1075,0
	124-16	1821,5	366,2	2187,7
	125-16	344,2	69,4	413,6
	126-16	789,7	142,1	931,8
	127-16	551,9	120,2	672,1
	12-17	317,8	61,0	378,8
	174-16	1971,7	505,4	2477,1
	175-16	658,6	155,7	814,3
	176-16	234,9	37,8	272,7
	177-16	350,8	84,6	435,3
	251-16	1195,3	294,7	1490,1
	253-16	228,2	42,4	270,6
Fubá	254-16	630,4	137,7	768,1
	255-16	450,6	82,6	533,2
	256-16	355,5	69,0	424,5
	257-16	754,9	184,3	939,2
	258-16	249,6	47,3	296,9
	264-16	222,2	42,2	264,4
	275-16	655,1	156,0	811,2
	276-16	241,2	46,2	287,4
	277-16	252,5	44,6	297,1
	278-16	583,2	132,0	715,1
	279-16	255,3	52,2	307,5
	280-16	2191,1	621,5	2812,6
	281-16	347,9	71,9	419,8
	283-16	2017,6	572,0	2589,7

Matriz	Cód.	FB1	FB2	FB1+FB2
	Amostras	Total	Total	Totais
Farinha de milho	261-16	138,7	33,5	172,2
	165-16	182,9	56,9	239,8
	06-17	308,2	108,6	416,8
	297-16	337,1	85,8	422,9
	04-17	340,0	121,3	461,3
	01-17	646,2	164,5	810,7
	260-16	115,5	29,8	145,2
Canjiquinha	16-17	124,2	28,6	152,8
	172-16	143,6	34,2	177,8
	18-17	159,5	41,9	201,4
	15-17	294,3	60,7	355,0
	259-16	358,9	74,5	433,4
	288-16	401,5	90,2	491,6
Curau de milho	241-16	666,8	128,6	795,5
	244-16	739,3	161,8	901,1
	240-16	949,1	223,0	1172,1

FB1: fumonisina B1; FB2: fumonisina B2.